

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



TESIS DOCTORAL

**Papel de los sistemas antigénicos HLA y MICA en la supervivencia y
el rechazo de injertos hepáticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Marcela Castillo Rama

Directora

Estela Paz Artal

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**PAPEL DE LOS SISTEMAS ANTIGÉNICOS HLA Y MICA EN LA
SUPERVIVENCIA Y EL RECHAZO DE INJERTOS HEPÁTICOS**

Memoria para optar al grado de Doctor, presentada por:

Marcela Castillo Rama

Bajo la dirección de la doctora:

Estela Paz Artal

Madrid, 2014.

Tesis Doctoral



PAPEL DE LOS SISTEMAS ANTIGÉNICOS HLA Y MICA EN LA SUPERVIVENCIA Y EL RECHAZO DE INJERTOS HEPÁTICOS

AUTORA: Marcela Castillo Rama

DIRECTORA: Dra. Estela Paz Artal

LUGAR DE REALIZACIÓN:

Servicio de Inmunología

Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

2014

La Dra. Estela Paz Artal, Doctora en Medicina y Cirugía, Jefa del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Doce de Octubre y Profesora Asociada en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado” Papel de los sistemas antigénicos HLA y MICA en la supervivencia y el rechazo de injertos hepáticos” ha sido llevado a cabo bajo su dirección por Dña. Marcela Castillo Rama, y reúne las condiciones para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado

Dra. Estela Paz Artal

Directora de la tesis

A Pedro

En primer lugar, quiero agradecer a mi jefa de servicio y mentora, la Dra. Estela Paz Artal, por incluirme en su equipo de investigación y por introducirme en el apasionante mundo del trasplante, además de guiar mis primeros pasos como médico interno residente y luego cómo investigadora. Gracias Estela por tu apoyo incondicional todos estos años, por siempre ponerme el listón alto y obligarme a dar más de mi, y por enseñarme el valor de la perseverancia y la constancia.

También quisiera agradecer a mi adjunta, la Dra. María José Castro por su inestimable ayuda y por su gentileza al poner a mi alcance todos los medios y recursos del laboratorio de histocompatibilidad para la realización de mi trabajo de tesis doctoral.

A los compañeros residentes, técnicos de laboratorio, personal administrativo y adjuntos del servicio de Inmunología del Hospital Doce de Octubre agradecerles por su compañerismo todos estos años. En especial quiero agradecer a mi “R mayor” la Dra. María Guzmán por no dejarme tirar la toalla nunca y por siempre estar allí para animarme, gracias “Marmotus”.

Gracias también a los compañeros de Coordinación de Trasplante y Trasplante Renal del Hospital Doce de Octubre, en especial a los doctores Chema Morales y Enrique Morales por permitirme rotar por su servicio y colaborar en sus proyectos de investigación, así como por tantas risas, noches de guardia y desayunos compartidos.

Finalmente, me gustaría agradecer al Profesor Regueiro y al Sr. Quijano de la Universidad Complutense de Madrid, por toda la ayuda que me prestaron para que aún estando fuera de España pudiese realizar todas las gestiones administrativas necesarias para llevar mi trabajo de tesis doctoral a buen puerto.

Tuve la suerte de seguir mi formación en el Thomas E. Starzl Transplantation Institute en la Universidad de Pittsburgh, Pensilvania, EEUU y quisiera agradecer a la directora del centro, la Dra. Jennifer Woodward, y al Dr. Angus W. Thomson por darme la oportunidad de trabajar en Estados Unidos así como a los doctores Diana M. Metes y Anthony J. Demetris por brindarme la oportunidad de formarme y trabajar en sus respectivos laboratorios.

A mi “familia urbana” en Pittsburgh: Marta y Jesús, Nayra y Manuel, Tamiro y Thomas, Eric, Loreto, Eli, Gabriel y Phoebe, Cheryl, Elisabet y Dan, Nila y Pinaki, con quienes he tenido la suerte de compartir tiempos muy felices y que me han cuidado y mimado en momentos difíciles, “gracias” no lo hubiese podido hacer sin vosotros. Love you guys! También a Patri y Ra, compañeras de aventuras desde los siglos de los siglos por siempre estar a mi lado en los momentos buenos y no tan buenos.

Y finalmente, quisiera agradecer a mi familia ya que sin ellos nada tendría sentido para mí. Gracias por vuestro sacrificio para poder darme la mejor educación, por alentarme a siempre seguir adelante, y por todo vuestro cariño y amor. Os quiero.

Índice

Índice	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VII
Abreviaturas	IX
I. INTRODUCCIÓN	
1. El hígado	1
1.1 De la magia a la ciencia	1
1.2 Anatomía del hígado	1
1.2.1 Anatomía macroscópica	1
1.2.2 Anatomía microscópica	3
1.3 Funciones del hígado	7
1.3.1 Producción de bilirrubina	7
1.3.2 Metabolismo de proteínas	7
1.3.3 Metabolismo de carbohidratos	8
1.3.4 Metabolismo de lípidos	8
1.3.5 Hemostasia	9
2. El Trasplante hepático	9
2.1 Recuerdo histórico	9
2.1.1 Primeros trasplantes hepáticos en humanos	10
2.1.2 Evolución del trasplante hepático en las últimas décadas	11
2.2 Estado actual del trasplante hepático en España	12
2.2.1 Características de los donantes hepáticos 1984-2012	13
2.2.2 Características de los receptores hepáticos 1984-2012	14
2.3 Indicaciones del trasplante hepático	15
2.3.1 Enfermedades tributarias de trasplante hepático	15
2.4 Contraindicaciones en el trasplante hepático (TOH)	16
2.5 Criterios de selección de receptores hepáticos	16
2.5.1 Clasificación Child-Turcotte-Pugh (CTP)	17
2.5.2 Formula MELD (Model End Stage Liver Disease)	17
2.6 Inmunosupresión en el trasplante hepático	18
2.6.1 Mecanismo de acción de los fármacos inmunosupresores	19
2.6.2 Principales fármacos inmunosupresores	20
2.6.3 Protocolos más utilizados en la inducción mantenimiento y tratamiento del rechazo	22
2.6.4 Tolerancia operacional	23
2.7 Complicaciones post-trasplante	24

2.8 Trasplante hepático pediátrico	25
2.8.1 Indicaciones para el trasplante hepático pediátrico	25
2.8.2 Contraindicaciones generales en el trasplante hepático pediátrico	26
2.8.3 Evaluación del candidato para trasplante hepático pediátrico	27
2.8.4 Formula PELD (Pediatric End-Stage Liver Disease)	28
3. Conceptos generales del reconocimiento aloimmune	28
3.1 Bases del reconocimiento alogénico	28
3.2 Vías de reconocimiento alogénico	29
3.2.1 Reconocimiento alogénico directo	30
3.2.2 Reconocimiento alogénico indirecto	32
3.2.3 Reconocimiento alogénico semi-directo	33
4. Reconocimiento aloimmune y rechazo del injerto hepático	34
4.2 Rechazo mediado por anticuerpos (AMR)	36
4.2.2 Papel de los anticuerpos en el trasplante	38
4.3 Rechazo agudo celular	42
4.4 Rechazo crónico	44
5. Sistemas antigénicos HLA y MICA	47
5.1 Genes y moléculas HLA de clase I	48
5.2 Genes y moléculas HLA de clase II	49
5.3 Función de las moléculas HLA	51
5.4 Expresión de antígenos HLA	51
5.5 Genes y moléculas MICA	52
5.6 Función de MICA	54
5.7 Función de MICA y NKG2D en el trasplante	55
5.8 MICA soluble (sMICA)	56
5.9 Expresión de antígenos MICA	57
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	60
III: MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. Población estudiada	64
1.1 Selección de receptores hepáticos	64
1.2 Definición de pérdida del injerto hepático y diagnóstico de rechazo	65
1.3 Inmunosupresión	65
2. Obtención y conservación del material biológico	66
2.1 Suero	66
2.2 Obtención de linfocitos totales y separación de linfocitos T y B del donante	66

2.3 Extracción de ADN	68
3. Determinación de antígenos HLA en el donante y receptor	68
3.1 Tipificación HLA por técnicas serológicas	68
3.1.1 Antígenos de clase I (HLA-A, -B, -C, -Bw4/Bw6)	68
3.1.2 Antígenos de clase II (HLA-DR, -DQ)	70
3.2 Tipificación HLA clase II por técnicas genéticas, o de genética molecular	70
4. Determinación de antígenos MICA	74
4.1 Población estudiada	74
4.2 Genotipaje de MICA por LABType®SSO	74
4.3 Asignación de genotipo MICA	78
5. Métodos de detección de anticuerpos.	78
5.1 Prueba cruzada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).	78
5.2 Citometría multiparamétrica Luminex xMAP.	80
5.2.1 Análisis cuantitativo de anticuerpos HLA y MICA por LABScreen®Mixed.	80
5.2.2 Análisis cualitativo de anticuerpos anti-MICA donante específicos por el ensayo LABScreen®Single Antigen.	81
5.2.3. Descripción del funcionamiento del aparato y análisis de los resultados	82
6. Estudio de expresión tisular en el hígado de antígenos MICA.	85
6.1 Población estudiada.	85
6.2 Inmunohistoquímica de MICA.	85
7. Análisis estadístico.	88
IV. RESULTADOS	89
1. Influencia de la compatibilidad HLA global en la supervivencia del aloinjerto	90
2. Influencia de la compatibilidad de los antígenos individuales del loci HLA en la supervivencia del aloinjerto	98
3. Influencia de los anticuerpos anti-HLA preformados (pre-trasplante) sobre la supervivencia del injerto	104
3.1. Anticuerpos anti-HLA detectados por CDC (prueba cruzada)	104
3.2 Anticuerpos anti-HLA preformados detectados por citometría multiparamétrica (Luminex xMAP®)	113
3.3 Concordancia entre técnicas CDC y Luminex® para la determinación de anticuerpos anti-HLA	117
4. Relación entre los anticuerpos anti-HLA preformados y el rechazo del aloinjerto	123

4.1 Anticuerpos anti-HLA detectados por CDC (prueba cruzada): papel en el rechazo.	123
4.2 Papel de los anticuerpos anti-HLA preformados detectados por citometría multiparamétrica (Luminex) en el rechazo.	126
5. Diversidad alélica de MICA en donante y receptor hepático, compatibilidad y supervivencia	128
6. Influencia de los anticuerpos preformados anti-MICA en la supervivencia del injerto.	130
7. Relación entre los anticuerpos preformados anti-MICA y el rechazo del aloinjerto hepático.	137
8. Expresión tisular de MICA en hígados trasplantados.	141
8.1. Comparación de la expresión de MICA entre hígado de donante cadáver y donante vivo.	143
8.2 Comparación de la expresión de MICA en hígado de donante cadáver entre tiempo cero y hepatectomía.	145
V. DISCUSIÓN	146
1. Variabilidad en el efecto de la compatibilidad HLA sobre la evolución del trasplante hepático.	147
2. Papel deletéreo de los anticuerpos anti-HLA preformados.	152
3. Polimorfismo y alogenicidad de MICA en el trasplante hepático	161
VI. RESUMEN	166
1. Resumen en español	167
2. Resumen en inglés	174
VII. CONCLUSIONES	182
VIII. BIBLIOGRAFÍA	185
VIX. ANEXO	205
1. Publicaciones derivadas del trabajo de tesis	

Figuras que aparecen en la sección “Introducción”:

Figura I1. Anatomía vascular del hígado	3
Figura I2. Micrografía electrónica de barrido (SEM) del endotelio de un capilar sinusoidal hepático humano.	6
Figura I3. San Cosme y San Damian. Matteo di Pacino (1370-75).	9
Figura I4. Número anual de TOH incluidos en el RETH	13
Figura I5. Evolución por fecha de trasplante de la edad del donante 1984-2002	14
Figura I6. Distribución del sexo de los receptores por grupos de edad 1984-2012	15
Figura I7. Modelo de las “tres señales” y lugar de acción de los diferentes fármacos Inmunosupresores	20
Figura I8. Vías de reconocimiento directo, indirecto y semi-directo	34
Figura I9. Patología del rechazo hepático.	46
Figura I10. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6	48
Figura I11. Moléculas MHC de clase I y clase II	50
Figura I12. Localización de los genes MIC en la región de clase I de HLA	53
Figura I13. Mecanismo de acción de MICA	57

Figuras que aparecen en la sección “Materiales y Métodos”

Figura M1. Microlinfocitotoxicidad estándar.	70
Figura M2. Tipaje HLA II mediante la técnica de PCR-SSO	74
Figura M3. Genotipaje MICA por LABTypeSSO	78
Figura M4. Citotoxicidad mediada por el complemento (prueba cruzada).	79
Figura M5. LABScreenMixed para la detección de anticuerpos preformados anti HLA y MICA	80
Figura M6. Tecnología xMAP	84
Figura M7. Método Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (LSAB).	87

Figuras que aparecen en la sección “Resultados”

Figura R1. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos basado en el número de incompatibilidades/mismatches (MM) entre donante y receptor.	91
Figura R2. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos re-trasplantados basado en los mismatches (0-3MM versus 4-6MM) entre donante y receptor.	96
Figura R3. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos	100
Figura R4. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con una prueba cruzada positiva (CDC+) versus aloinjertos con una prueba cruzada negativa (CDC-).	106
Figura R5. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con una prueba cruzada positiva (CDC+) versus aloinjertos con una prueba cruzada negativa (CDC-): CDC T CDC B y CDC T y B.	111
Figura R6. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con anticuerpos anti-HLA preformados Luminex + versus aloinjertos sin anticuerpos preformados Luminex-.	115
Figura R7. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos basado en el número de incompatibilidades (mismatches) en MICA.	129
Figura R8. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con anticuerpos preformados anti-HLA+/-MICA versus aquellos sin anticuerpos anti-HLA+/-anti-MICA.	134
Figura R9. Estudio por Luminex Single Antigen (LSA) para determinar la presencia de anticuerpos (ac) pre-formados donante específicos en el suero pre-trasplante.	136
Figura R10. Detección por inmunohistoquímica de expresión tisular de MICA en muestra de colon humano incluida en parafina.	142
Figura R11. Expresión de MICA en hígado de donantes a tiempo cero.	144
Figura R12. Expresión tisular de MICA en biopsia de hígado sano procedente de paciente fallecido por enfermedad respiratoria.	144
Figura R13. Expresión tisular de antígenos MICA en dos muestras de donante de hígado cadáver.	145

Tablas que aparecen en la sección “Introducción”

Tabla I1. Indicaciones de TOH.	15
Tabla I2. Clasificación Child-Turcotte-Pugh (CTP).	17
Tabla I3. Indicaciones para trasplante hepático pediátrico.	26
Tabla I4. Gradación del rechazo agudo (global assessment).	43
Tabla I5. Índice de la actividad del rechazo agudo.	44
Tabla I6. Expresión de antígenos HLA en el hígado.	52

Tablas que aparecen en la sección “Materiales y Métodos”

Tabla M1. Hepatopatías en los pacientes trasplantados.	65
Tabla M2. Mezcla de amplificación para preparación de PCR-SSO.	71
Tabla M3. Condiciones de PCR-SSO.	72
Tabla M4. Mezcla de amplificación para PCR para ensayo LABType® SSO.	75
Tabla M5. Condiciones de PCR para el ensayo LABType® PCR-SSO.	75
Tabla M6. Preparación de la mezcla de hibridación.	76
Tabla M7. Volúmenes de SAPE y tampón de SAPE.	77
Tabla M8. Especificidades antigénicas del kit LABScreenMixed.	81
Tabla M9. Clasificación de positividad de anticuerpos anti-MICA.	84
Tabla M10. Clasificación de positividad de ensayo Luminex single antigen.	85
Tabla M11. Valoración de la tinción MICA.	87

Tablas que aparecen en la sección “Resultados”

Tabla R1. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en el número de mismatches (MM).	92
Tabla R2. Impacto de la compatibilidad HLA en la supervivencia del injerto hepático basado en mismatches (MM) por tres o cuatro grupos.	93
Tabla R3. Impacto de la compatibilidad HLA (0-3MM versus 4-6MM) en la supervivencia del injerto en base a la hepatopatía original.	95
Tabla R4. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos re-trasplantados basado en el número de mismatches HLA (0-3MM versus 4-6MM) entre donante y receptor.	97
Tabla R5. Impacto de los antígenos del loci HLA en la supervivencia del injerto hepático.	99

Tabla R6. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en número de mismatches (MM) en el locus HLA-A.	101
Tabla R7. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en número de mismatches (MM) en el locus HLA-B.	102
Tabla R8. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en número de mismatches (MM) en el locus HLA-DR.	103
Tabla R9. Influencia de los anticuerpos preformados anti-HLA detectados por CDC en la supervivencia del injerto hepático.	107
Tabla R10. Supervivencia de los aloinjertos basada en la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA detectados por CDC.	110
Tabla R11. Supervivencia de aloinjertos con anticuerpos anti-HLA detectados por CDC a 1,3 y 5 años.	112
Tabla R12. Supervivencia de aloinjertos con anticuerpos anti-HLA detectados por Luminex a 1,3 y 5 años.	114
Tabla R13. Supervivencia (a 5 años) de los aloinjertos basada en la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA detectados por Luminex.	116
Tabla R14. Comparación entre CDC y Luminex xMAP para la detección de antígenos HLA de clase I y II en receptores hepáticos.	121
Tabla R15. Comparación de la supervivencia a 1,3 y 5 años entre los grupos A-H.	122
Tabla R16. Episodios de rechazo en pacientes trasplantados hepáticos.	124
Tabla R17. Asociación entre rechazo global, agudo y crónico y CDC.	125
Tabla R18. Asociación entre rechazo global, agudo y crónico y Luminex.	127
Tabla R19. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en el número de mismatches MICA entre donante y receptor.	129
Tabla R20. Frecuencia de alelos MICA en receptores y donante.	130
Tabla R21. Impacto de los anticuerpos preformados anti-MICA en la supervivencia del injerto a 1,3 y 5 años.	135
Tabla R22. Asociación entre rechazo global, agudo y crónico y HLA +/- MICA.	140
Tabla R23. Asociación entre rechazo agudo y crónico y CDC +/- MICA.	141

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMR	Rechazo mediado por anticuerpos (Acute Mediated Rejection)
APC	Células presentadoras de antígeno (Antigen presenting cells)
ATG	Globulina anti-timocito (Anti-thymocyte globulin)
BCR	Receptor de la célula B (B cell receptor)
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation ej: CD3, CD28)
CDC	Citotoxicidad mediada por complemento (Complement dependent cytotoxicity).
CMV	Citomegalovirus
CTP	Child-Turcotte-Pugh
DAP 10	Proteína adaptadora DAP10 (DNAX adaptor protein of 10kDa).
DC	Células dendríticas (Dendritic cells)
EBV	Virus de Epstein Barr (Epstein-Barr Virus)
EC	Células endoteliales (Endothelial cells)
GGT	Gamma glutamil transferasa
GVHD	Enfermedad injerto contra huésped (Graft versus host disease)
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (Human Leukocyte Antigen)
HO-1	Hemi-oxigenasa 1
HSP70	Proteína de choque térmico 70 (Heat Shock Protein 70)
IC	Inhibidores de la calcineurina
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleukina
INR	Ratio Internacional Normalizada (International Normalized Ratio)
ITIM	Motivos de inhibición de inmunoreceptor basados en tirosina (Tyrosine based inhibition motif)

KLRK1	(Killer cell lectin-like receptor subfamily member 1)
MAP-cinasa	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases)
MAC-IP	Proteína inhibidora del complejo de ataque a membrana (Membrane attack complex inhibitory protein)
MEC	Matriz Extracelular
MELD	Model End Stage Liver Disease
MFI	Intensidad media de fluorescencia (Mean fluorescence intensity)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
MIC	Gen MIC (Major Histocompatibility Class I chain related gene)
MM	Incompatibilidades (Mismatches)
MMF	Micofenolato Mofetil
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos (Mammalian Target of Rapamycin)
mTORC1	Complejo mTOR1 (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1)
NPC	Células no parenquimatosas (Non parenchymal cells)
NK	Células Natural Killer (Natural Killer cells)
NKG2D	Receptor NKG2D (Natural killer group 2 member D)
UDPGT	Uridina-difosfato-glucuronato-glucuronil-transferasa
UNOS	United Network Organ Sharing
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-1	Inhibidor activador del plasminógeno tipo 1 (Plasminogen activator inhibitor 1).
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral blood mononuclear cell)
PELD	Pediatric End-Stage Liver Disease

PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa (Phosphatidylinositol-3-kinase)
Rag	Genes activadores de recombinación (Recombination activation gene)
RAI	Índice de la actividad global de rechazo (Rejection activity index)
RETH	Registro Español de Trasplante Hepático
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species,)
rpm	Revoluciones por minuto (Revolutions per minute)
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Institute)
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa (Severe Combined Immunodeficiency)
SEC	Células sinusoidales endoteliales (Sinusoid endothelial cells)
SEM	Micrografía electrónica de barrido (Scanning electron micrograph)
sMICA	MICA soluble (Soluble MICA)
SSO	Hibridación de oligonucleótidos específicos de secuencia (Sequence specific oligonucleotide)
TAP	Proteína transportadora asociada con el procesamiento antigénico (Transport associated proteins)
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TCR	Receptor de la célula T (T cell receptor)
TOH	Trasplante ortotópico hepático
Tx	Trasplante
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor)
VHB	Virus Hepatitis B
VHC	Virus Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana
WB	Tampón de lavado (Wash Buffer)

Introducción

1. El hígado

1.1 De la magia a la ciencia

Desde la antigüedad, el hígado ha sido objeto de gran especulación. Considerado el asiento del alma y el centro de la vida para muchas civilizaciones, su función ha estado rodeada de misterio durante siglos. En la medicina asirio-caldeo babilónica, la hepatoscopia animal constituía una práctica adivinatoria habitual, extendida siglos después a la civilización etrusca y romana (1). Tan común era su práctica que incluso hay referencias bíblicas a ella (Ezequiel XXI-21):

*“Porque el rey de Babilonia se ha detenido en una encrucijada, al principio de los dos caminos, para usar de adivinación; ha sacudido las saetas, consultó a sus ídolos, **miró el hígado**”.*

El hígado también ocupó un lugar destacado en los ritos funerarios del Antiguo Egipto, y tanto en los Textos de las Pirámides, como en el Libro de los Muertos, Amset, uno de los cuatro hijos divinos de Horus y guardián del hígado, ocupa un rol central (2).

Varios siglos después, el estudio del hígado pasó de ser mágico-religioso a biológico-científico. Erasístrato (s.III a.c), uno de los primeros anatomopatólogos de la historia, realiza múltiples estudios anatómicos descriptivos del hígado y las vías biliares siendo éste el punto de partida de nuevas corrientes de pensamiento que permitieron a médicos y científicos empezar a desentrañar los misterios de este órgano (3).

1.2 Anatomía del hígado

1.2.1 Anatomía macroscópica

El hígado es la víscera de mayor tamaño en el cuerpo. Se desarrolla a partir del divertículo hepático del intestino en la cuarta semana de gestación (4) y ocupa un lugar

único como “barrera fisiológica” entre la sangre portal y el resto del organismo (5).

Con un peso aproximado de 1500g y unas dimensiones de 15 x 20 cm en el plano coronal y transversal, se sitúa bajo la cúpula diafragmática derecha protegido en su cara anterior por las costillas del hemitórax. En su cara superior está relacionado con la pleura y el pulmón derecho (separados por el diafragma), en su cara inferior con el colon derecho, el duodeno y el páncreas y en su cara posterior con el riñón derecho (5, 6).

El hígado, recubierto por una membrana fibrosa (la capsula de Glisson) se puede dividir desde un punto de vista anatómico o funcional. En el primer caso, el ligamento falciforme divide el hígado en lóbulo izquierdo y derecho en su cara anterior. En su cara posterior/inferior se distinguen dos lóbulos más pequeños: el lóbulo caudado (posterior) y el cuadrado (más anterior) (5). La división funcional del hígado está basada en las ramificaciones vasculares (7) y biliares (8) de cada segmento (Figura I1).

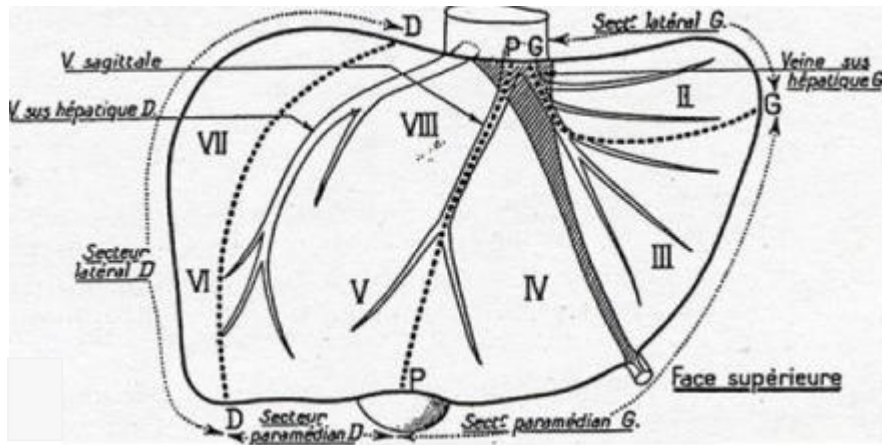
La vascularización del hígado se efectúa a través de un sistema vascular dual de la vena porta y la arteria hepática. La vena porta contribuye 75-80% del volumen sanguíneo (procedente del bazo, intestino, estómago, páncreas) y el 20-25% restante de sangre lo aporta la arteria hepática. Ambos troncos vasculares entran al hígado mediante el hilio hepático y se dividen en ramas izquierda y derecha, dividiéndose sucesivamente en ramas más pequeñas hasta confluir en sinusoides intrahepáticos (6).

En el mismo hilio se encuentra la confluencia de los conductos biliares hepáticos izquierdo y derecho que forman el conducto hepático común. El sistema biliar incluye los canalículos biliares, los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, las glándulas peribiliares, vesícula biliar y ampolla de Vater (6)

En el hígado, los vasos linfáticos se dividen en dos redes; una profunda que discurre paralelamente a las grandes ramas de la vena porta y la arteria hepática y una

superficial localizada en la capsula, con anastomosis entre ambas redes. Los vasos linfáticos hepáticos terminan en ganglios del hilio y abocan al conducto torácico (6).

A.



B.

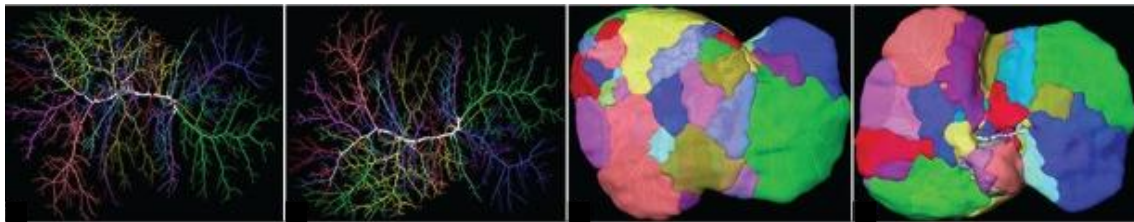


Figura II. Anatomía vascular del hígado A) Ilustración original de la segmentación hepática de Couinaud. B) Vena porta y sus ramas en un hígado humano. Las primeras dos imágenes (cara anterior y posterior) son una reconstrucción de imagen en tomografía de la vena porta y sus ramas secundarias y terciarias. Las últimas dos imágenes representan los territorios irrigados por ramas de la vena porta de segundo y tercer orden. (Adaptado de Couinaud (7) y Fasel (9)).

1.2.2 Anatomía microscópica

El hígado normal está constituido por una trama conectiva de sostén (matriz extracelular), elementos celulares (células parenquimatosas y no parenquimatosas) y elementos vasculares (sinusoides).

1.2.2.1 Matriz extracelular (MEC)

La matriz extracelular (MEC) es el tejido conjuntivo que forma el andamiaje que presta soporte a la capsula, los espacios porta, venas centrales y paredes sinusoidales. Esta estratégicamente localizada entre el torrente sanguíneo y el parénquima hepático. Sus componentes incluyen: colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas aunque éstos varían según la localización. Además de su función mecánica de soporte, la MEC también cumple funciones biológicas facilitando la proliferación y migración celular, diferenciación y expresión génica (10, 11) .

1.2.2.2 Células parenquimatosas

Los hepatocitos son las células parenquimatosas del hígado. Constituyen un 65% del total de células hepáticas y un 80% del volumen del hígado. Son células poliédricas, con un núcleo central, esférico y uno o más nucléolos, y que cumplen funciones metabólicas, endocrinas y secretoras.

Los hepatocitos se organizan en láminas de una célula de espesor separadas por canales vasculares (sinusoides). Su membrana citoplasmática está recubierta de microvellosidades en su superficie sinusoidal (basolateral) y sus paredes laterales coalescen para formar canalículos biliares que drenan a los espacios porta (5).

1.2.2.3 Células no parenquimatosas (NPC)

1.2.2.3.1 Células citotóxicas (“Pitt cells”)

Caracterizadas como células natural killer (NK) del hígado, estos linfocitos con actividad citotóxica hacia hepatocitos tumorales o infectados por virus (12) constituyen el 3% de las NPC. Se localizan en el endotelio vascular en el lumen sinusoidal (13).

1.2.2.3.2 Células estrelladas del hígado (células de Ito, lipocitos)

Las células estrelladas hepáticas, constituyen un 20% de las NPC. Su localización perisinusoidal (espacio de Disse), así como sus características

prolongaciones citoplasmáticas, les permiten interaccionar con otras células estrelladas, hepatocitos, células endoteliales y terminaciones nerviosas (14).

En estado quiescente almacenan retinoides, además de mantener la homeostásis en el sinusoide hepático (mediante la secreción de factores autocrinos, paracrinos, yuxtacrinos y factores quimioatrayentes) (14) y en la matriz extracelular (mediante la producción y degradación de componentes de la matriz: colágenos, metaloproteinasas etc) (15). También secretan citoquinas y factores de crecimiento involucrados en la regeneración de células hepáticas endoteliales (16). En condiciones patológicas (activadas), sufren una transdiferenciación fenotípica a miofibroblastos y participan en la fibrogenesis, la cirrosis hepática y posiblemente en el control vasomotor del flujo sanguíneo sinusoidal (14).

1.2.2.3.3 Células de Kupffer

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado. Normalmente adheridas a las células endoteliales, especialmente en la zona periportal, también tienen una alta motilidad que les permite circular entre ambos lados del sinusoide (12).

Constituyen un 29% del total de células NPC y son las primeras células del sistema fagocítico mononuclear en entrar en contacto con antígenos. Proceden del tracto gastrointestinal y penetran al hígado con la sangre portal. Además de sus funciones fagocitarias intervienen en el metabolismo de lipoproteínas y pueden modular la respuesta inmunitaria actuando como células presentadoras de antígeno (APC), regulando la activación de linfocitos T y desarrollando tolerancia a ciertos antígenos de origen gastrointestinal (13).

Se activan en respuesta a compuestos tóxicos y secretan mediadores inflamatorios, radicales libres de oxígeno y aniones superóxido, enzimas y citocinas

(IL-1, IL-6, IL-10, TNF α). Además de protectores del hígado, también pueden mediar el daño hepático por ejemplo en respuesta al alcohol o la isquemia-reperfusión (17, 18).

1.2.2.3.4 Células endoteliales y sinusoides

Las células sinusoidales endoteliales (SEC) son células con una alta capacidad endocítica que constituyen la pared sinusoidal que separa el sinusoides del espacio de Disse y constituyen el 48% de las NPC (13). El sinusoides (constituido por las SEC) es un capilar hepático único debido a la presencia de poros o fenestras, y la ausencia de diafragma o lamina basal (19) (Figura I2). Las fenestras actúan como biofiltro permitiendo el tráfico bi-direccional de macromoléculas, solutos y partículas entre la sangre sinusoidal y el parénquima hepático (12). Se observa una mayor densidad de fenestras en la zona centrilobular del hígado, y el citoesqueleto de éstas, compuesto de actina, miosina (20) y calmodulina (21), modula su diámetro. En hígados cirróticos las SEC pierden su porosidad desarrollando un fenotipo vascular que influye en el fallo hepático y la hipertensión portal al causar isquemia atrofica del hepatocito e incrementar la fibrogenesis (22).

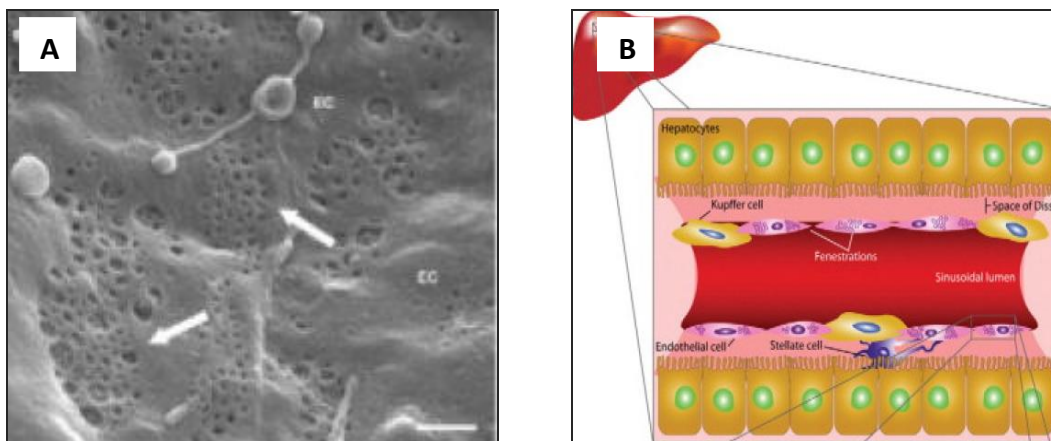


Figura I2. A) Micrografía electrónica de barrido (SEM) del endotelio de un capilar sinusoidal hepático humano. Las flechas señalan las fenestras, las células marcadas como “EC” son células endoteliales B) Representación esquemática de un sinusoides hepático. (Adaptado de Jacobs (23).

1.3 Funciones del hígado

1.3.1 Producción de bilirrubina

La bilirrubina es un producto del catabolismo de la porción hemo de las hemoproteínas procedentes de la destrucción de hematíes maduros y del catabolismo de hemoproteínas hísticas (mioglobina, catalasa, citocromo).

La bilirrubina conjugada con albumina se transporta al polo sinusoidal de los hepatocitos donde se desprende de la albumina sérica para adentrarse en el interior del hepatocito donde se convierte primero en monoglucuronidos de bilirrubina y luego en bilirrubina diglucurónica (bilirrubina directa hidrosoluble) mediante su unión a la glutatión-S-transferasa y proteína Z proceso catabolizado por la UDPGT (uridina-difosfato-glucuronato-glucuronil-transferasa). La bilirrubina hidrosoluble se excreta en los canales biliares y se almacena en la vesícula biliar en periodos interdigestivos o se vierte directamente en la luz intestinal para su utilización en procesos que incluyen: a) la eliminación de sustancias liposolubles b) solubilización de lípidos a nivel intestinal c) eliminación de colesterol y compuestos tóxicos d) producción de hormonas necesarias en el desarrollo del intestino e) funciones inmunológicas de protección de infecciones entéricas mediante la producción de IgA y otras citocinas inflamatorias y f) homeostasis del colesterol corporal (5) (24).

1.3.2 Metabolismo de proteínas

El hígado cataboliza más de la mitad de aminoácidos exógenos o procedentes de la alimentación y los transforma en urea para su eliminación, o los utiliza en la síntesis endógena de nuevas proteínas: estructurales y secretoras (membranas del retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi) enzimas de membrana involucradas en metabolismo y todas las proteínas plasmáticas con la excepción de las inmunoglobulinas.

Durante el ciclo de la urea, la acción de 5 enzimas hepáticas (amilofosfatasa, ornitintrancarbamilasa, argininosuccinotasa, argininosuccinolasa y arginasa) transforman sustancias nitrogenadas y compuestos amoníacos procedentes del catabolismo de aminoácidos en una sustancia de desecho, la urea (5).

1.3.3 Metabolismo de carbohidratos

Mediante la retención de azúcares de la alimentación y el metabolismo de carbohidratos, el hígado cumple una función vital en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el cuerpo. El hígado puede transformar la glucosa en glucógeno para su almacenamiento (glucogenogénesis), y en la ausencia de glucosa puede transformar aminoácidos y lípidos en glucógeno (neoglucogénesis), despolimerizar el glucógeno en glucosa (glucogenolisis) y finalmente transformar la glucosa en ácido pirúvico (glucólisis) (5).

1.3.4 Metabolismo de lípidos

El hígado cumple una función central en el metabolismo de lípidos (colesterol, fosfolípidos y triglicéridos) que serán utilizados como sustrato para la producción de ácidos biliares, hormonas esteroideas o en la síntesis de fosfolípidos que forman parte de las membranas celulares del cuerpo. También influyen en el metabolismo de lipoproteínas plasmáticas (quilomicrones, proteínas de alta, intermedia, baja o muy baja densidad) responsables en el transporte de triglicéridos desde el hígado a tejidos periféricos en periodos de ayuno (5) . En varias enfermedades hepáticas crónicas (hepatitis crónica, carcinoma hepatocelular, enfermedades colestásicas) se observa una dislipidemia con composiciones y niveles anormales de lípidos (25).

1.3.5 Hemostasia

Todos los factores de coagulación (con excepción del factor von Willebrand), así como sus inhibidores y proteínas fibrinolíticas son producidos por el hígado. La pérdida de tejido parenquimatoso que ocurre en enfermedades hepáticas terminales se asocia a alteraciones en la hemostasia que incluyen: fallos en la producción de factores de coagulación, fibrinólisis excesiva, coagulación intravascular diseminada, trombocitopenia y disfunción plaquetaria (26). La función hemostática del hígado es uno de los parámetros que se utiliza para evaluar a un posible receptor hepático.

2. El Trasplante hepático

2.1 Recuerdo histórico

Las primeras referencias al homotrasplante con fines terapéuticos están descritas por Jacobo Vorágine en su “Leyenda Dorada” (s XIII) y representadas en obras de arte del Quattrocento y del Renacimiento (Matteo di Pacino, Pedro Berruguete, Fernando del Rincón, Fra Angelico). En ellas se describe el milagro de los Santos Cosme y Damián a quienes se les atribuye el trasplante de la pierna de un enfermo por la de un donante fallecido de raza negra (27) (Figura I3).



Figura I3. San Cosme y San Damian. Matteo di Pacino (1370-75). Museo de Arte Carolina del Norte, EEUU.

Sin embargo, pasan varios siglos hasta que el trasplante se convierte en una realidad clínica. En el caso del hígado, las primeras referencias bibliográficas aparecen en 1955: CS Welch (28) describía el homotrasplante hepático auxiliar en perros que consistía en la inserción de un hígado auxiliar en el espacio parietocólico sin alterar la anatomía del hígado nativo, con revascularización de la arteria hepática vía aorta o arteria ilíaca y el flujo portal venoso vía cava inferior (en lugar de la vena porta). Aunque el uso de inmunosupresores prevenía el rechazo del injerto, con esta técnica de revascularización el injerto se atrofiaba considerablemente debido a una “insulinopenia hepática”. Al no recibir sangre venosa portal/pancreática el hígado no recibía sustancias hepatotróficas (como la insulina) necesarias para su correcto funcionamiento (29).

En 1956 se introduce el concepto de trasplante ortotópico hepático (TOH) (30), en el que el hígado nativo se extrae previo a la implantación del aloinjerto. En los siguientes años equipos independientes en Chicago (31) y Boston (32) desarrollan varias técnicas quirúrgicas incluidas la hepatectomía total del hígado receptor, similar a lo que hoy se conoce como trasplante en *piggyback* (33) (que en este caso incluye preservación de la vena cava del receptor), que mejorarían la supervivencia del aloinjerto.

2.1.1 Primeros trasplantes hepáticos en humanos

Los primeros TOH en humanos se inician en 1963. El primer trasplante, realizado el 1 de marzo de 1963 en un niño con atresia biliar fracasa, pero los siguientes trasplantes aunque no exitosos, son esperanzadores. Finalmente, en el verano de 1967 Thomas E. Starzl realiza con éxito el primer TOH en un niño que sobreviviría más de dos años post trasplante (34). En España son los doctores Carles Margarit y Eduardo Jaurrieta del hospital de Bellvitge de l'Hospitalet quienes el 23 de febrero de 1984 trasplantan con éxito el primer hígado en un paciente adulto (35).

2.1.2 Evolución del trasplante hepático en las últimas décadas

Los tres elementos que permitieron un avance importante en la aplicabilidad clínica del TOH fueron: 1. mejores métodos de preservación del hígado 2. nuevos fármacos inmunosupresores e 3. innovaciones técnicas intra y peri-operatorias.

2.1.2.1 Métodos de preservación del aloinjerto hepático

En sus inicios, para prevenir la isquemia, se reducía el metabolismo celular de los injertos hepáticos mediante su inmersión en una solución salina congelada o bien mediante la infusión intravascular (vía vena porta) de soluciones electrolíticas (Ringer lactado, Collins, Eurocollins). Aunque estas primeras soluciones permitían la preservación del órgano, tenían una ventana de actuación muy corta de 5-6 horas (24).

En 1987 la solución de Wisconsin, que logra preservar el hígado más de 18hrs, revoluciona el mundo del trasplante (36, 37). A nivel logístico permite incrementar el “pool” de donantes (no solo donantes de la misma ciudad), y permite que las cirugías y la hemostasia se puedan hacer pausadamente. Asimismo, se observa una mejor función hepática, menor frecuencia de trombosis de arteria hepática y menos re-trasplantes que con soluciones convencionales (38).

Más recientemente, nuevas tecnologías apuntan a un cambio de los tradicionales métodos hipotérmicos a métodos normotérmicos que mantienen el metabolismo celular del hígado en un microambiente más fisiológico hasta su implantación (39).

2.1.2.2 Desarrollo de nuevos fármacos

La evolución de terapias inmunosupresoras, fue clave en el avance del TOH ya que aunque la técnica quirúrgica estaba bien establecida no existían fármacos inmunosupresores adecuados. En 1978 Roy Calne (40) introduce la ciclosporina, y ésta se combinaba con prednisona un año después en Denver (41). La supervivencia de los aloinjertos hepáticos se incrementó considerablemente, sin embargo no fue hasta que se

sustituyó la ciclosporina por el tacrolimus (42) que la supervivencia subió por encima del 80% al año post trasplante.

2.1.2.3 Innovaciones técnicas y cuidados peri-operatorios

La correcta extracción del hígado donante constituye uno de los pilares del éxito en un trasplante hepático. El enfriamiento corporal total fue una de las innovaciones técnicas que incrementó la aplicabilidad de los TOH permitiendo la extracción del hígado sin comprometer la integridad de otros órganos intra-abdominales (43).

Las hemorragias masivas y las coagulopatías fueron dos de las complicaciones más importantes en los primeros años del TOH. El uso de bypass veno–venoso sin anticoagulantes para prevenir hemorragias, y el uso de la tromboelastografía que monitoriza los cambios en la viscoelasticidad de la sangre redujeron la incidencia de complicaciones (44).

En relación a los aspectos quirúrgicos, las complicaciones de los conductos biliares (obstrucciones, fístulas, y colangitis) que anteriormente afectaban a más del 30% de los pacientes trasplantados se redujeron mediante el uso de colédoco-coledocostomía con tubo en T y colédoco-yeyunostomía en Y de Roux (45). En el TOH pediátrico, la bipartición del hígado (“Split”) redujo la escasez de órganos previamente condicionada por el número limitado de donantes pediátricos (46).

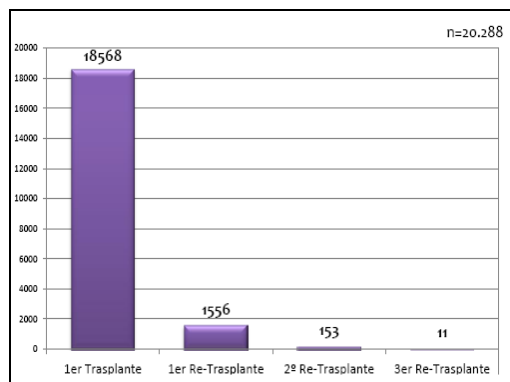
2.2 Estado actual del trasplante hepático en España

Cada año se realizan más de 21,000 trasplantes hepáticos en el mundo según el Registro Mundial de Trasplantes gestionado por la ONT (Organización Nacional de Trasplantes) y la OMS (Organización Mundial de la Salud). De este total, España, que constituye el 0.7% de la población mundial realiza un 5.4% de los TOH (47).

Desde el comienzo del programa de TOH en 1984 a 2012 se realizaron 20,423 trasplantes de los cuales 20,288 trasplantes primarios y 1,720 re-trasplantes fueron

registrados en el RETH (Registro Español de Trasplante Hepático). Un 93.7% de trasplantes primarios fueron electivos frente a un 6.3% urgentes (48) (Figura I4).

A.



B.

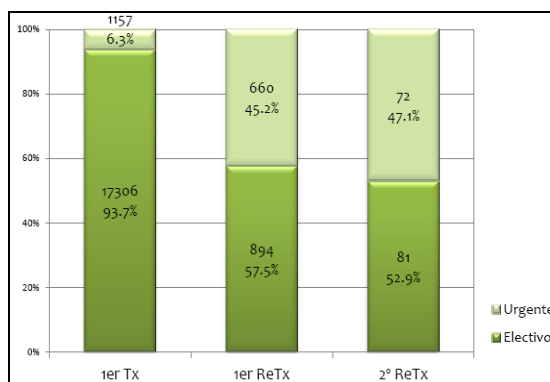


Figura I4. A. Número anual de TOH incluidos en el RETH B. Trasplantes urgentes y electivos 1984-2012. (Adaptado de Memoria de Resultados 2012 Registro Español de Trasplante Hepático (48)).

2.2.1 Características de los donantes hepáticos 1984-2012

Donantes por muerte encefálica

Los aloinjertos hepáticos proceden de donante cadáver (97.7%), vivo (1.6%) ó dominó (0.6%) de donantes con edades comprendidas entre los 0-75+ años. Entre 1984-1994 la mayoría de los donantes (49.9%) tenían de 16 a 34 años, mientras que de 2001-2012 un 37.5% tenían edades entre los 55 y 74 años (48).

Las tres causas de muerte más importantes en el donante (2001-2012) han sido: accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico (TCE), y anoxia. La supervivencia (1990-2012) de los injertos hepáticos fue mayor en los procedentes de donante por muerte por TCE (48) (Figura I5).

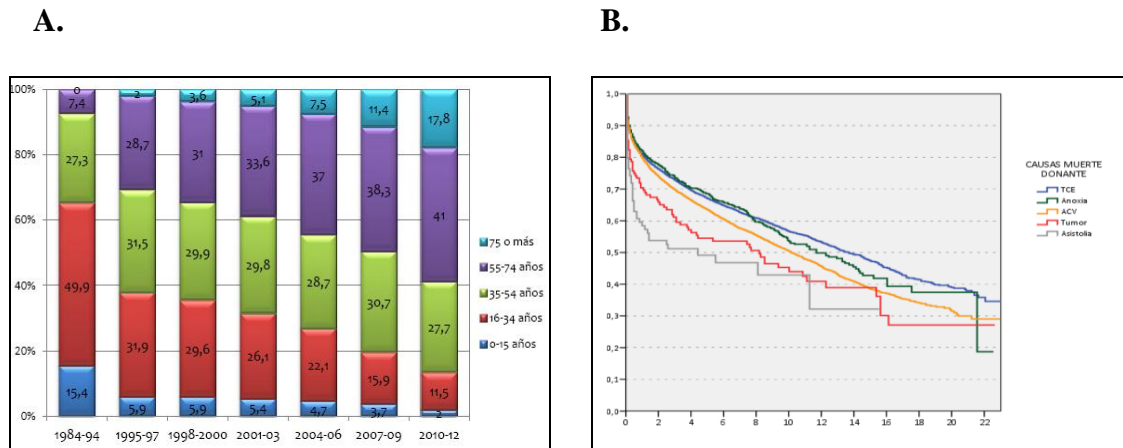


Figura I5. A. Evolución por fecha de trasplante de la edad del donante 1984-2002 B. Supervivencia del injerto según causa de muerte del donante (tx electivo en receptor adulto) 1990-2012. (Adaptado de Memoria de Resultados 2012 Registro Español de Trasplante Hepático (48))

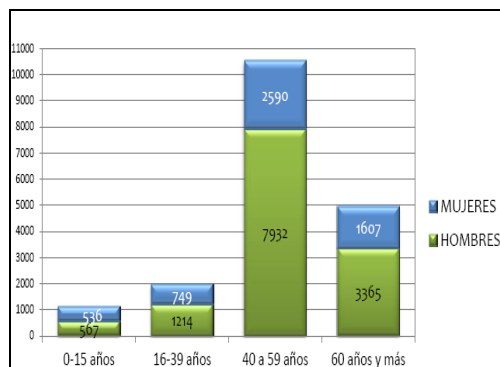
Donantes en asistolia

Aunque la mayoría de donantes hepáticos son por muerte encefálica, debido a la escasez de órganos y un mayor número de personas en lista de espera, en España también existen programas de donación hepática en asistolia controlada y no controlada. La experiencia en este último tipo de trasplante es más limitada y en España sólo es vigente en tres centros (H. 12 de Octubre, H. Clínic de Barcelona y C.H.U.A Coruña) (49) incluido el centro donde se realizó este trabajo (50).

2.2.2 Características de los receptores hepáticos 1984-2012

Desde 1984, la mayoría de receptores hepáticos en España han sido hombres (70.46 % en comparación con 29.5% mujeres), principalmente en edades comprendidas entre los 40 y 59 años. Las tres patologías más comunes en receptores hepáticos han sido: la cirrosis hepatocelular (sin carcinoma), hepatocarcinoma y colestasis (48) (Figura I6).

A.



B.

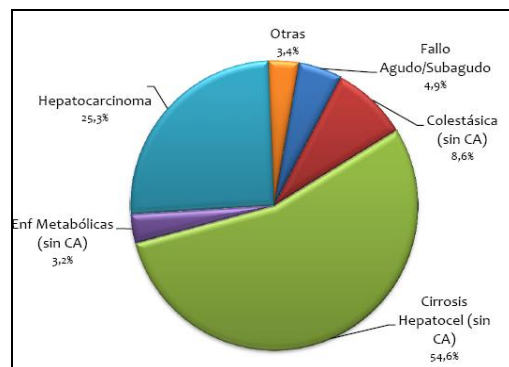


Figura I6. A. Distribución del sexo de los receptores por grupos de edad 1984-2012 B. Patología de base del receptor en el primer trasplante 1984-2012. (Adaptado de Memoria de Resultados 2012 Registro Español de Trasplante Hepático (48).

2.3 Indicaciones del trasplante hepático

Las indicaciones de TOH han cambiado en las últimas décadas. Inicialmente reservado casi exclusivamente para pacientes con hepatopatías terminales, en la actualidad es una terapia para el tratamiento de hepatopatías agudas o crónicas no reversibles siempre y cuando no haya una contraindicación específica (24).

2.3.1 Enfermedades tributarias de trasplante hepático

Las enfermedades tributarias de TOH se pueden dividir en las siguientes cinco categorías genéricas (51) (Tabla II).

1. Cirrosis de predominio hepatocelular
Posthepatíticas (VHB, VHC)
Alcohólica
Autoinmune
Criptogénica
2. Colestasis crónicas
Cirrosis biliar primaria
Colangitis esclerosante primaria
Cirrosis biliar secundaria
Atresia de vías biliares
3. Tumores hepáticos
Primarios
Metástasis de tumores endocrinos
4. Insuficiencia hepática aguda grave
5. Enfermedades congénitas y metabólicas

VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C.

Tabla II: Indicaciones de TOH (Adaptado de Prieto (51).

En España las indicaciones más frecuentes de TOH son la cirrosis secundaria a infección por virus de la hepatitis C, y la cirrosis alcohólica (51).

2.4 Contraindicaciones en el trasplante hepático (TOH)

A medida que ha ido evolucionando el TOH las contraindicaciones en su uso terapéutico han ido disminuyendo. Las contraindicaciones se dividen en absolutas o relativas. Las absolutas son enfermedades sistémicas que incluyen: sepsis activa, enfermedad cardíaca o pulmonar severa no controlable y tumores malignos extrahepáticos. Las contraindicaciones relativas corresponden a factores de riesgo de mortalidad que deben evaluarse de forma personalizada en cada posible receptor hepático (24). Por si solas, no constituyen un impedimento para el trasplante, pero la suma de varias contraindicaciones relativas podría convertirse en una contraindicación absoluta (52).

2.5 Criterios de selección de receptores hepáticos

Los dos sistemas de medición de insuficiencia hepatocelular utilizados para evaluar al enfermo cirrótico son la clasificación Child-Turcotte-Pugh (CTP) y la fórmula MELD (Model End Stage Liver Disease). Ambos sistemas miden la mortalidad en lista de espera, sin tener en cuenta otras variables (calidad de vida etc). Mediante estos sistemas se seleccionan receptores en los que los beneficios del TOH no generan una mortalidad superior al curso normal de la enfermedad, y que aumentan la supervivencia del enfermo a largo plazo. También, aunque no son perfectos, intentan “homogenizar” el acceso a lista de espera.

2.5.1 Clasificación Child-Turcotte-Pugh (CTP)

La clasificación modificada Child-Turcotte-Pugh (53, 54) estratifica la severidad de la enfermedad hepática en base a 5 parámetros hepáticos: grado de ascitis, concentración plasmática de bilirrubina y albúmina, tiempo de protrombina y grado de encefalopatía (Tabla I2).

Tabla I2. Clasificación Child-Turcotte-Pugh (CTP)

	Puntuación		
	1	2	3
Bilirrubina total (mg/dL)	<= 2mg/dL	2-3mg/dL	>3mg/dL
Albúmina en suero (g/dL)	>3.5g/dL	3.5-2.8 g/dL	<2.8g/dL
PT INR	<4seg (<1.8)	4-6seg (1.8-2.3)	>6seg (>2.3)
Ascitis	ausente	moderado	severo-refractario
Encefalopatía hepática	ausente	moderada (I-II)	severa (III-IV)

Tabla I2: Cada parámetro recibe una puntuación de 1 a 3 dependiendo de la gravedad: una puntuación de 5-6 se considera grado A (enfermedad bien compensada), puntuación de 7-9 grado B (compromiso funcional significativo) y de 10 a 15 se considera grado C (enfermedad descompensada).

Según la política de asignación de órganos (utilizando la clasificación CTP) de UNOS (United Network Organ Sharing) los enfermos en lista de espera se estratifican en tres grupos basado en la severidad de su enfermedad: Estatus 3 (puntuación CTP ≥ 7), estatus 2B (puntuación CTP ≥ 10) y estatus 2A (puntuación CTP ≥ 10 , en cuidados intensivos con un pronóstico de vida de 7 días) (55).

2.5.2 Formula MELD (Model End Stage Liver Disease)

La formula MELD predice el riesgo de mortalidad de un enfermo con hepatopatía en lista de espera de acuerdo a tres parámetros: INR (Ratio Internacional Normalizada), creatinina y bilirubina en suero (56, 57). El rango de puntuación va de 6-40 puntos; un puntaje menor apunta a un mejor pronóstico mientras que un puntaje mayor implica peor pronóstico y mayor prioridad.

Según las recomendaciones descritas en el Documento de consenso de la Sociedad Española de Trasplante Hepático de 2008 (58) sólo los pacientes con cirrosis

descompensada con una puntuación de ≥ 7 en la clasificación CTP y >10 en la clasificación MELD deberán ser incluidos en lista de espera.

$$\text{Formula MELD (55): } 10 \times [0.957 \times \log_e (\text{creatinina mg/dL})] + 0.378 \times \log_e (\text{bilirrubina mg/dL}) + 1.120 \times \log_e (\text{INR}) + 0.643$$

2.6 Inmunosupresión en trasplante hepático

Los fármacos inmunosupresores se utilizan en la inducción, mantenimiento y tratamiento del rechazo del aloinjerto hepático. Una inmunosupresión óptima debe cumplir cinco condiciones. En primer lugar debe prevenir el rechazo del aloinjerto, a la vez que evita la toxicidad. Asimismo debe prevenir la morbilidad en los enfermos, causando el mínimo de efectos secundarios. Finalmente, la terapia inmunosupresora se debe modificar basándose en factores del receptor como la edad, el grupo étnico y la etiología de la enfermedad hepática original.

La edad juega un papel importante en los resultados a corto y largo plazo del TOH. En la población pediátrica, el tratamiento inmunosupresor es de por vida por lo que la toxicidad y morbi-mortalidad en este grupo incrementan (59). Esta población también es más susceptible a las infecciones y efectos secundarios gastrointestinales. En adultos el metabolismo, la absorción y la distribución del fármaco son diferentes a los del paciente pediátrico. Además, muy a menudo hay otras enfermedades de fondo cuyo tratamiento farmacológico puede causar interacciones con los inmunosupresores.

La farmacogenética es otro factor a tener en cuenta, sobre todo en personas que tienen una alta prevalencia de polimorfismos en el citocromo P450 3A, una enzima que participa en el metabolismo de inhibidores de la calcineurina, que incrementan la

eliminación del fármaco y reducen su biodisponibilidad incrementando el riesgo del rechazo (60).

Finalmente en ciertos grupos diagnósticos (pacientes con fallo renal o síndrome hepatorenal, enfermedades hepáticas autoinmunes (61), hepatitis viral (62), o fallo hepático fulminante) se tiene que modificar/personalizar el tratamiento inmunosupresor ya que por su patología original pueden tener mayor índice post TOH de disfunción renal, viremia, recurrencia de la enfermedad, o baja tolerancia a agentes neurotóxicos y nefrotóxicos. Por ejemplo en pacientes trasplantados por un carcinoma hepatocelular no es recomendable utilizar inhibidores de la calcineurina que incrementan la angiogenesis y la recurrencia tumoral, sino el uso de fármacos como el sirolimus que tiene propiedades anti-tumorales además de inmunosupresoras (63).

2.6.1 Mecanismo de acción de los fármacos inmunosupresores

Los inmunosupresores actúan en diferentes etapas de la activación y proliferación de linfocitos T, de acuerdo al conocido “modelo de las tres señales”, la señal 1 se genera cuando la célula presentadora de antígeno (APC) activa al linfocito T mediante una señal antígeno-específica modulada por el complejo CD3, tras el reconocimiento por parte del TCR de un antígeno presentado en la molécula del MHC. La señal 2 es una señal co-estimuladora que se genera a partir del acoplamiento del ligando B7 en las ACP y el receptor CD28 en la célula T. La combinación de las señales 1 y 2 activa tres vías de transducción intracelular: 1) la vía del calcio-calcineurina, 2) la vía MAP-quinasa activada por Ras, y 3) la vía del factor nuclear kB (Figura I7). El resultado de todas ellas es la activación de factores de transducción que generan nuevas moléculas como la IL-2, que actúa de forma autocrina ligándose a su receptor en la membrana linfocitaria (CD25) y amplificando la activación (3ª señal). La activación del

linfocito T aumenta la expresión de moléculas como CD154 y CD25 que participan en la activación de otra vía de señalización intracelular, la de mTOR (mamalian target of Rapamycin) que causa proliferación celular. La proliferación y diferenciación celular llevan a la producción de células T y B efectoras (64).

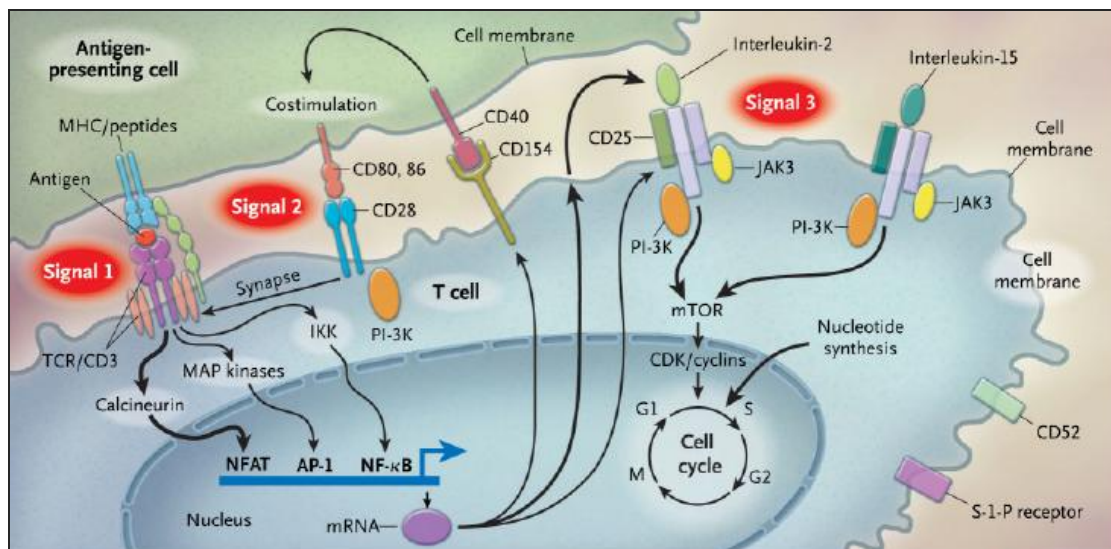


Figura I7. Modelo de las “tres señales” y lugar de acción de los diferentes fármacos inmunosupresores (Adaptado de Halloran (64)).

2.6.2 Principales fármacos inmunosupresores

2.6.2.1 Inhibidores de la calcineurina (IC)

Los IC más utilizados en el trasplante hepático son la ciclosporina y el tacrolimus (FK506). Estos fármacos funcionan uniéndose a proteínas celulares de los linfocitos (la ciclosporina a la ciclofilina y el tacrolimus a la FK506 “binding protein”) y creando complejos que se unen a la calcineurina. Esta unión previene su translocación nuclear, inhibiendo la actividad fosfatasa de la calcineurina, impidiendo la cascada calciodependiente que lleva a la transcripción de IL-2 y finalmente a la activación y proliferación de linfocitos T (63, 64).

2.6.2.2 Inhibidores de la síntesis de nucleótidos

La azatioprina y el micofenolato mofetil (MMF) son los dos fármacos de esta categoría que han sido más comúnmente utilizados en el trasplante hepático. El MMF es actualmente el más utilizado de los dos y funciona inhibiendo la enzima inosina monofosfato dehidrogenasa que es reguladora de la vía de novo de las purinas. Esto tiene como consecuencia que la guanosina no se incorpora al ADN de las células lo cual se traduce en un efecto antiproliferativo sobre los linfocitos T y B activados (63, 65).

2.6.2.3 Inhibidores de mTOR

Los inhibidores del mTOR funcionan bloqueando el complejo mTORC1, responsable de la proliferación celular. Al igual que el tacrolimus se unen a la inmunofilina FKBP pero en este caso forman un complejo con mTORC1 que impide que las células progresen de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Los dos inhibidores de mTOR más utilizados en TOH son el sirolimus y el everolimus, con especial utilidad en pacientes con carcinoma hepatocelular debido a su capacidad para inhibir la angiogénesis, el crecimiento celular y la progresión metastática (63).

2.6.2.4 Timoglobulina y ATG

La timoglobulina y la ATG (globulina anti-timocito) se generan a partir de la inoculación de conejos con timocitos humanos. Funcionan causando una depleción de timocitos mediante lisis celular mediada por complemento que, en el contexto de un trasplante, permitiría “resetear” el sistema inmune del receptor haciéndole adaptarse al aloinjerto y reconociéndolo como propio (66).

2.6.2.5 Anticuerpos monoclonales

Basiliximab (Novartis, NJ, USA) es un anticuerpo anti-CD25 específico para la cadena α del receptor de la IL-2 expresada en linfocitos T activados (67). Alemtuzumab (Campath-1, Genzyme, MA USA) es un anticuerpo anti-CD52 que es selectivo para linfocitos, monocitos, macrófagos, células NK y timocitos de la circulación y los nódulos linfáticos periféricos (68).

La mayoría de los inmunosupresores tienen como diana los linfocitos T pero las reacciones mediadas por linfocitos B también contribuyen al rechazo agudo y crónico por lo que fármacos como el rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que actúa en células pre-B y células B maduras son también de utilidad (69).

Lamentablemente la terapia inmunosupresora también tiene efectos secundarios y su uso continuado incrementa la morbilidad en receptores hepáticos (70). Se describen en el apartado 2.7 las complicaciones post trasplante que incluyen enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, osteoporosis, infecciones, tumores y fallo renal (63).

2.6.3 Protocolos más utilizados en la inducción, mantenimiento y tratamiento del rechazo

Actualmente se han establecido terapias inmunosupresoras de inducción, administrada al inicio del trasplante, de mantenimiento y de tratamiento del rechazo del injerto.

En general el protocolo de inducción común está constituido por doble terapia con esteroides y ciclosporina o tacrólimus. Si el paciente presentara toxicidad por el anticalcineurínico, se complementaría con la adición de MMF (reduciendo la dosis del fármaco tóxico) o se sustituiría en función del grado de neurotoxicidad o nefrotoxicidad

alcanzada. La adición de MMF a los esteroides y ciclosporina o tacrólimus constituye la segunda terapia más frecuentemente utilizada denominada triple terapia inmunosupresora. En el caso de que se requiera la adición de basiliximab o anticuerpos anti-CD3 para evitar el uso de fármacos nefrotóxicos en pacientes con disfunción renal, se añadirá a cualquiera de las terapias anteriores, disminuyendo la dosis de anticalcineurínico.

En la terapia de mantenimiento (desde el tercer mes) se busca disminuir o retirar los fármacos más tóxicos: retirada de esteroides en la doble o triple terapia (baja dosis de anticalcineurínico con MMF o inhibidores de mTOR), o administración de MMF o inhibidores de mTOR o ambos.

Para el tratamiento del rechazo agudo se emplea el ajuste de dosis de anticalcineurínico, la adición de MMF o inhibidores de mTOR a la doble terapia, el intercambio de anticalcineurínicos o finalmente el rescate con esteroides o anticuerpos monoclonales tipo basiliximab (71-74).

2.6.4 Tolerancia operacional

La tolerancia operacional, una función estable del aloinjerto en ausencia de inmunosupresión, es posible en el TOH aunque por el momento los resultados en varios centros tienen una tasa de éxito del 0 al 38%. Sin duda, aunque el objetivo final es el de conseguir inducir la tolerancia hay que encontrar un punto de balance para preservar el injerto, a la vez que se minimiza la toxicidad renal, sin crear un microambiente proclive a las infecciones o la recurrencia de enfermedades (Hepatitis C, tumores etc) (75, 76).

2.7 Complicaciones post-trasplante

Hasta el primer año post-trasplante ocurren complicaciones postoperatorias, normalmente relacionadas con problemas técnicos de tipo arterial, venoso, biliar o de la pared abdominal. Son frecuentes las infecciones, en general por bacterias y virus, sobre todo CMV, infecciones banales por herpes y reinfecciones del injerto por VHC. Aparecen en menor medida infecciones por hongos, micobacterias y protozoos. Aunque no muy frecuente, la enfermedad injerto contra huésped (GVHD), que puede aparecer entre las semanas 2^a y 6^a, reviste importancia por su elevada mortalidad (superior al 50%). Se manifiesta clínicamente por fiebre, rash cutáneo, diarrea y citopenias, aunque la funcionalidad del injerto en principio no se ve afectada.

El diagnóstico de GVHD es complicado ya que muchos de los síntomas pueden estar causados por reacciones farmacológicas adversas o por infecciones virales incluyendo citomegalovirus (77).

Las complicaciones médicas en el primer año post-trasplante pueden afectar a cualquier sistema, aunque suelen ser con mayor frecuencia de tipo respiratorio, renal o metabólico, en este último caso en forma de diabetes y dislipemias.

Los problemas a largo plazo están principalmente causados o relacionados con el uso prolongado de inmunosupresores. Estos problemas pueden ser generales, asociados a la inmunosupresión *per se* y por tanto a cualquier inmunosupresor, o específicos de cada fármaco particular. Entre los primeros se incluyen las infecciones oportunistas, tumores *de novo* o recidiva de la enfermedad de base (VHC y hepatocarcinoma). Los específicos incluyen insuficiencia renal crónica, hipertensión arterial, diabetes mellitus, hiperlipidemia, obesidad, osteoporosis y neurotoxicidad, generalmente asociados a corticoides y anticalcineurínicos, y la

mielotoxicidad, con aparición de anemia, leucopenia y/o trombopenia, frecuentemente asociados a micofenolato y sirolimus.

En el otro extremo del espectro, es decir, por inmunosupresión insuficiente, pueden aparecer episodios de rechazo. Las distintas formas se explican pormenorizadamente más adelante (ver sección 4).

La recidiva de la hepatitis C y la consiguiente progresión a cirrosis es un problema de gran entidad para el trasplante hepático. No se conoce con exactitud el papel de los distintos inmunosupresores sobre el VHC, ya que la mayoría de los estudios son retrospectivos y con resultados contradictorios, lo que impide obtener datos concluyentes.

Finalmente, sin relación con la inmunosupresión, a largo plazo pueden aparecer también problemas técnicos, como trombosis o estenosis arterial, dificultad en el drenaje venoso y complicaciones biliares, que en ocasiones requieren de retrasplante para su solución (78).

2.8 Trasplante hepático pediátrico

2.8.1 Indicaciones para el trasplante hepático pediátrico

El trasplante hepático pediátrico es un procedimiento de riesgo, con alta mortalidad y su realización conlleva una discapacidad crónica con administración de drogas inmunosupresoras a largo plazo. Sin embargo, al igual que en los adultos, en algunas patologías es la única terapia curativa disponible (79).

La mejora en los inmunosupresores diseñados para pacientes pediátricos, así como la aplicación de variaciones quirúrgicas (ej: Split) han mejorado considerablemente los trasplantes de órgano pediátrico (80). A groso modo las indicaciones de trasplante hepático pediátrico se pueden dividir en 5 grupos (Tabla I3):

enfermedades hepáticas con progresión a fallo hepático, enfermedad hepática sin progresión a fallo hepático pero que tiene efectos secundarios con consecuencias y riesgos mayores que el trasplante, terapia para enfermedades de tipo hepático-metabólicas, enfermedades hepáticas secundarias y tumores hepáticos primarios (81).

Tabla I3. Indicaciones para trasplante hepático pediátrico (81)

Indicación	Frecuencia
Fallo hepático	95%
Atresia biliar	62%
Deficiencia de alpha-1 antitripsina	8%
Colestasis intrahepática familiar progresiva	7%
Fallo hepático fulminante	5%
Colangitis esclerosante primaria	3%
Hepatitis Autoinmune	2%
Hepatitis Neonatal	2%
Cirrosis postnecrótica	2%
Tirosinemia	2%
Cirrosis biliar secundaria	1%
Enfermedad de Wilson's	<1%
Fibrosis hepática congénita	<1%
Enfermedad hepática no progresiva	<1%
Síndrome de Alagille	<1%
Errores innatos	<1%
Enfermedades de almacenamiento de glucógeno	<1%
Defectos del ciclo de la urea	<1%
Enfermedades hepáticas secundarias	2%
Síndrome fibrosis quística	1%
Histiocitosis de células de Langerhans	1%
Tumores hepáticos primarios	1%
Hepatoblastoma	1%

2.8.2 Contraindicaciones generales en el trasplante hepático pediátrico

Existen tres contraindicaciones generales al trasplante hepático pediátrico. La primera contraindicación importante es el deterioro de otros órganos. Por ejemplo, los enfermos con síndrome de Alagille, una enfermedad genética que causa anomalías en los conductos biliares del hígado, también causa alteraciones cardíacas severas (ej: estenosis de las arterias pulmonares) (82). En ciertos casos, el trasplante hepático sería

una contraindicación por no aportar ningún beneficio al enfermo o porque un trasplante multi-orgánico sería la opción terapéutica más correcta.

La segunda contraindicación relativa es la existencia de enfermedades sistémicas agudas. Finalmente la recurrencia post trasplante de ciertas patologías como un cáncer metastático, enfermedad de origen viral (VIH, hepatitis C o B) podrían ser una contraindicación al trasplante (83, 84) .

2.8.3 Evaluación del candidato para trasplante hepático pediátrico

Muchos niños con enfermedad hepática sufren daño al sistema nervioso central (eg: retraso en el desarrollo psicomotor, retraso en la destreza motriz gruesa etc.) Aunque la encefalopatía se puede revertir con el trasplante hepático, los daños causados por el edema cerebral pueden ser irreversibles. Es importante tener éste y otros factores en consideración a la hora de evaluar al enfermo pediátrico para trasplante hepático.

En primer lugar hay que confirmar el diagnóstico y asegurarse de que el niño realmente se va beneficiar del trasplante, puesto que hay enfermedades hepáticas que tienen un pronóstico excelente sin necesidad de trasplante. Otro factor a tener en cuenta, si fuera necesario, es el momento de la realización del trasplante ya que la demora en incluir a un enfermo pediátrico en lista de espera podría suponer daño irreversible a otros órganos además del hígado.

Pre-trasplante también hay que evaluar las posibles complicaciones infecciosas derivadas del mismo. Por ejemplo, una infección por CMV en el paciente pediátrico podría causar una infección seria post trasplante, un EBV podría generar una enfermedad linfoproliferativa etc. También es importante saber el estatus de las vacunas del niño ya que estos pacientes son más vulnerables, por ejemplo cuando se ven expuestos a la varicela (85, 86).

2.8.4 Formula PELD (Pediatric End-Stage Liver Disease)

El método actual utilizado para predecir la probabilidad de muerte en lista de espera de un paciente pediátrico (hasta los 11 años) con enfermedad hepática terminal es la puntuación PELD (Pediatric End-Stage Liver Disease) que se basa en cinco parámetros: albúmina sérica, bilirrubina total, INR, retraso del crecimiento y edad del paciente (si es menor de un año) (55, 87, 88).

$$\begin{aligned} \text{Formula PELD(55)} : & 0.43 \text{edad } (<1 \text{ año}) - 0.687 \log_e \text{ albumina (g/dL)} + \\ & 0.480 \log_e \text{ bilirrubina total mg/dL} + 1.857 \log_e \text{ INR} + 0.667 \text{ fallo en el} \\ & \text{crecimiento } (<-2SD) \end{aligned}$$

3. Conceptos generales del reconocimiento aloimmune

3.1 Bases del reconocimiento alogénico

En un receptor de órgano inmunocompetente, el trasplante de un aloinjerto procedente de un donante de la misma especie pero dispar a nivel genético (trasplante alogénico) desencadena una respuesta inmune en el receptor. El término “respuesta alogénica” hace referencia a la capacidad del sistema inmune de reconocer y rechazar células o tejido alogénico mediante sistemas receptor-ligando. Los receptores de células T y B (TCR y BCR respectivamente) juegan un papel clave a la hora de reconocer antígenos polimórficos (ligandos) del donante. La ausencia de inmunosupresión puede causar que estas interacciones lleven al rechazo. Por tanto, la aloinmunidad del receptor constituye una de las barreras principales en la aceptación espontánea de un tejido u órgano trasplantado (89).

A groso modo, se puede considerar “alogénico” a cualquier antígeno o grupo de antígenos presentes en el donante y ausentes en el receptor, y que por lo tanto pueden

desencadenar una respuesta inmunológica en el receptor que puede culminar con el rechazo del aloinjerto caracterizado por inflamación, distorsión arquitectónica del tejido e infiltración del aloinjerto con linfocitos T efectores (89).

Debido a su polimorfismo, su expresión ubicua y su capacidad de iniciar una respuesta policlonal de células T, el MHC (HLA en humanos del inglés Human Leucocyte Antigen) constituye uno de estos antígenos alogénicos “diana” que pueden desencadenar una respuesta inmunológica en el receptor. Sin embargo, una compatibilidad en los loci HLA entre donante y receptor no es sinónimo con una aceptación espontánea del aloinjerto, si bien puede prolongar el tiempo de vida del órgano trasplantado. Además del papel que juegan los antígenos del sistema MHC (ó HLA), otras moléculas polimórficas, tales como los antígenos del sistema menor de histocompatibilidad y los sistemas del grupo sanguíneo ABO (90) pueden iniciar mecanismos de rechazo del aloinjerto si los antígenos son extraños al huésped.

3.2 Vías de reconocimiento alogénico

Se han descrito tres tipos de reconocimiento alogénico: directo, indirecto y semi-directo. Ninguno de estos mecanismos de reconocimiento es mutuamente excluyente, aunque desencadenan eventos moleculares distintos, involucran células presentadoras de antígeno (APC) de distinto origen (del donante o del receptor), reconocen moléculas MHC variadas (del receptor, del donante o de ambos) y finalmente pueden jugar un papel de mayor o menor relevancia en diferentes etapas del trasplante (rechazo agudo o crónico) (91).

3.2.1 Reconocimiento alogénico directo

La respuesta alogénica directa se inicia cuando células T aloreactivas del receptor reconocen de forma íntegra (directamente, sin previo procesamiento del antígeno) el complejo péptido + molécula MHC del donante en APC del donante. Estas APC son “células pasajeras” del donante que aún permanecen en espacios intravasculares y extravasculares del aloinjerto tras el trasplante. Hay dos puntos importantes a tener en cuenta en el reconocimiento alogénico directo, el primero es que hay una alta frecuencia de células T aloreactivas con especificidad para moléculas MHC alogénicas y el segundo que en esta vía de reconocimiento alogénico no se cumplen las normas de restricción de células T por MHC propio, puesto que en este caso el MHC pertenece al donante (92).

Pietra y colaboradores (93) fueron los primeros en demostrar la implicación de la vía de reconocimiento alogénica directa en el rechazo en un modelo de trasplante cardíaco en ratones SCID y Rag $-/-$. Demostraron que la transferencia de linfocitos CD4 $^{+}$ singénicos por sí solos podían causar rechazo agudo del aloinjerto, siempre y cuando se unían a moléculas MHC II del donante (vía directa). Cuando se unían a moléculas MHC del receptor (vía indirecta) esto causaba una vasculopatía en el aloinjerto pero no era suficiente como para provocar el rechazo del órgano.

Para comprender el papel que juega la vía directa en el rechazo es importante considerar el comportamiento de linfocitos naïve y de memoria en las primeras semanas post trasplante. Los linfocitos T aloreactivos se desarrollan a partir de linfocitos naïve del receptor que migran a nódulos linfáticos donde son activados por péptidos presentados por APC “pasajeras” provenientes del donante. Lo mismo ocurre con linfocitos CD4 $^{+}$ de memoria que una vez activados son capaces de atravesar el

endotelio vascular y penetrar el aloinjerto. Este proceso sólo ocurre en las primeras semanas post trasplante cuando aún hay células pasajeras presentadoras de antígeno provenientes del donante. El funcionamiento exacto de estas células CD4+ activadas en el aloinjerto se desconoce, puesto que en este caso la respuesta antígeno específica de moléculas MHC se limita a células parenquimales, a diferencia de lo que ocurriría *in situ* en un tejido inflamado en una respuesta antígeno específica convencional (91).

A largo plazo la respuesta allogénica directa parece perder relevancia. Varios grupos que han estudiado la evolución de la respuesta allogénica anti-donante de células CD4+ y CD8+ en el aloinjerto renal y cardíaco han observado una hiporespuesta a los cuatro meses en la mayoría de pacientes caracterizada con una disminución importante en la frecuencia de linfocitos T aloreactivos. Baker y colaboradores (94) estudiaron la frecuencia de células CD4+ secretoras de IL-2, del fenotipo CD45RA+(nāive) y CD45RO(memoria) en receptores renales en respuesta a células estimuladoras de su donante y de donantes terceros (“third party” donors) antes y después del trasplante. Observaron que las células T CD4+CD45RA permanecieron prácticamente inalterables, sin embargo hubo un descenso importante en el componente de células de memoria CD45RO, capaces de penetrar el aloinjerto. Los investigadores especularon que esta hiporespuesta podría ser consecuencia de las propias células parenquimales que, aunque expresan MHC de clase I en su superficie, no resultan inmunogénicas puesto que no expresan moléculas co-estimuladoras, y por lo tanto en algunas situaciones incluso pueden producir anergia en los linfocitos T. En conclusión, aunque la repuesta allogénica directa es importante en las primeras semanas post-trasplante parece perder relevancia a largo plazo.

3.2.2 Reconocimiento alogénico indirecto

Este reconocimiento se denomina “indirecto” porque requiere un paso intermedio de procesamiento antigénico. Ocurre cuando células T aloreactivas del receptor reconocen péptidos procedentes de antígenos del donante procesados por células APC del receptor y presentados unidos a moléculas MHC propias; es decir, péptido del donante unido a un complejo MHC+APC del receptor. Éste sería el mecanismo habitual de restricción de células T por MHC propio (92, 95).

Los trasplantes de aloinjerto de piel en ratones realizados por Auchincloss y colaboradores (96) fueron clave para demostrar el papel de la vía indirecta de aloreconocimiento en el rechazo. Los experimentos se realizaron en tres líneas de ratón (C57BL/6J, C3H.SW y BALB/cByJ) en las que se les deplecionó linfocitos CD4+ ó CD8+ con el objetivo de que fueran dependientes de un tipo de linfocito o del otro. Estos ratones recibieron un aloinjerto de piel procedente de un ratón knockout” para MHC de clase II, y que por lo tanto dependía de MHC de clase I para presentación antigénica. Cuando eliminaban los linfocitos CD8+ del receptor para hacerlo dependiente de los linfocitos CD4+ y éste recibía un aloinjerto de piel MHC II -/- , el sistema inmune del receptor (los CD4+) sólo podían reconocer péptidos del donante si estos estaban unidos a moléculas MHC de clase II. Puesto que el donante no tenía moléculas MHC de clase II, el sistema inmune de ratón era completamente dependiente de sus propias moléculas MHC de clase II para el procesamiento y presentación de antígenos procedentes del donante. De esta forma demostraron que la vía indirecta, que es el mecanismo habitual de presentación antigénica, jugaba un papel importante en el rechazo del órgano.

3.2.3 Reconocimiento allogénico semi-directo

Finalmente, se ha propuesto una tercera vía de reconocimiento allogénico denominada semi-directa por la cual células T aloreactivas del receptor pueden reconocer péptidos integros (directamente) o procesados (indirectamente) unidos a moléculas MHC del donante o del receptor (propias) (97). El mecanismo radica en la habilidad de células dendríticas (DC), células presentadoras de antígeno especializadas, en capturar antígeno de células necróticas o en proceso de apoptosis (98), así como de células vivas (99) y presentarlo en su superficie de forma íntegra (sin procesar) para su posterior presentación a linfocitos T citotóxicos. Harshyne et al (99) describieron que las DC, tanto las de fenotipo inmaduro como las de fenotipo maduro, tienen la capacidad de capturar moléculas MHC, antígeno tumoral endógeno, así como proteínas citoplasmáticas o de membrana procedentes de varios tipos de célula (linfocitos T y B, otras células dendríticas y macrófagos) mediante contacto célula-célula, o la captura de exosomas o antígeno soluble. Estudios posteriores (97) demostraron que las DC también son capaces de capturar moléculas MHC allogénicas procedentes de células endoteliales inflamadas, y que este complejo MHC una vez expuesto en la superficie de la DC era funcional y capaz de inducir una proliferación policlonal de linfocitos T. Finalmente, en humanos este fenómeno de transferencia de moléculas intactas de HLA del donante a la superficie de células DC del receptor también se ha observado en estudios donde células DC eran capaces de adquirir moléculas HLA específicas (HLA-A2 y HLA-DR*001) de tumores melanocíticos y luego expresarlas de forma íntegra en su superficie (100).

Por lo tanto, la vía de aloreconocimiento semi-directa lograría combinar simultáneamente un reconocimiento allogénico directo en el que el complejo péptido +

molécula MHC de un donante sería transferido de forma íntegra a la superficie de la célula presentadora de antígeno del receptor (de la forma anteriormente descrita). Simultáneamente, el reconocimiento alógeno en la APC también se podría dar de la forma habitual (vía indirecta) por la cual un antígeno ajeno sería degradado y procesado en el interior de la célula para su posterior ensamblaje en moléculas MHC del receptor (propias).

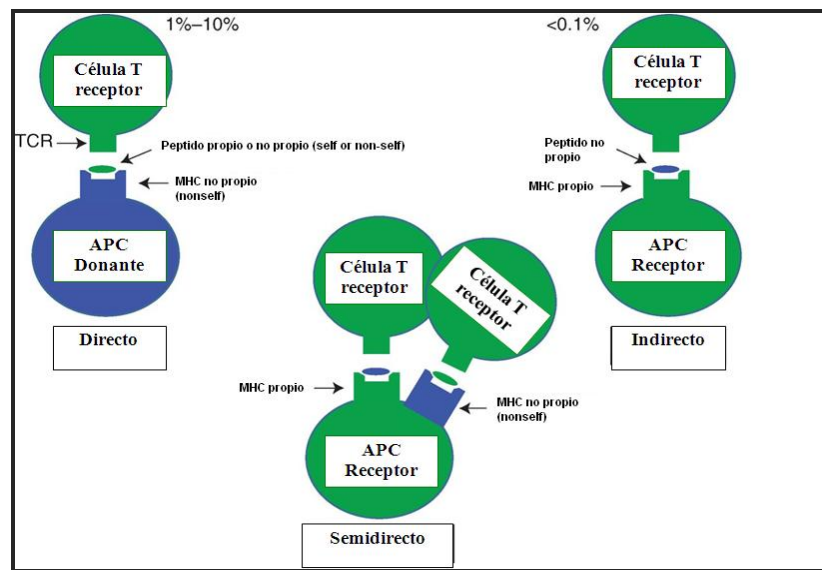


Figura I8. Vías de reconocimiento directo, indirecto y semi-directo (Adaptado de Lakis (89)).

4. Reconocimiento aloinmune y rechazo del injerto hepático

Además de realizar multitud de funciones metabólicas, el hígado desempeña un papel importante en la respuesta inmune. Interviene en la producción de proteínas de fase aguda y factores del complemento, participa en la fagocitosis no específica de la inmunidad innata, en la delección de linfocitos T activados y constituye un lugar de proliferación extra-tímica de células T. En el hígado adulto de un humano son linfocitos el 25% de las células no parenquimales, lo que supone unos 10 billones de células, aunque este número varía bajo condiciones de estrés. El hígado contiene además una

población de macrófagos residentes (células de Kupffer) con función fagocítica e implicada en los mecanismos de tolerancia (101, 102). Todas estas características hacen que el trasplante hepático presente ciertas peculiaridades inmunológicas como son la relativa resistencia al rechazo mediado por anticuerpos, la posibilidad de aparición de enfermedad injerto contra huésped o la elevada frecuencia de pacientes que desarrollan tolerancia operacional.

Renna-Molajoni y colaboradores (103) así como otros grupos (104) sugirieron que la vía de reconocimiento alogénica indirecta constituía uno de los mecanismos por el cual ocurría el rechazo hepático. Algunos estudios han demostrado que el complejo MHC (moléculas de HLA) puede jugar un papel “dual” (105). Por una parte una mayor compatibilidad MHC (HLA) entre donante y receptor puede llevar a un descenso en el rechazo, pero a su vez esta similitud antigénica puede activar otros mecanismos inmunológicos (por ejemplo recurrencia de la patología original) que llevan en última instancia a la pérdida del órgano. Además de ésta paradoja, algunos estudios han sugerido que el injerto hepático puede diseminar moléculas MHC (HLA) de clase I que tienen efectos tolerogénicos. Por el contrario el epitelio vascular y biliar que incrementa su expresión de moléculas MHC (HLA) de clase II en respuesta al daño inmunológico pueden contribuir a fomentar la aloreactividad de linfocitos T. Sin embargo, puesto que el epitelio vascular y biliar del hígado no expresan la molécula co-estimuladora B7 requerida para activar los linfocitos T, la vía directa de aloreconocimiento no podría explicar el mecanismo de rechazo en el hígado.

Para estudiar la contribución de la vía indirecta en el rechazo de hígado, se siguieron a 23 pacientes trasplantados hepáticos durante un periodo de 6 a 82 semanas (103) y se estudió la respuesta de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ a antígenos HLA-DR (MHC

de clase II) provenientes de esplenocitos de su donante. Concluyeron que la presencia de linfocitos CD8⁺ era inversamente proporcional al rechazo del aloinjerto y que eran los linfocitos CD4⁺ los responsables de activar la cascada de eventos que culminaba con el rechazo del hígado. Estudios previos (106) habían demostrado que un “subset” de linfocitos CD8 (linfocitos CD8⁺CD28⁻) funcionaban como células supresoras. Estos linfocitos reconocían moléculas MHC de clase I en células APC, y que esta interacción inhibía la expresión de las moléculas co-estimuladoras B7 (CD80 y CD86) en la superficie de las APC necesarias para activar linfocitos CD4⁺ y que estos secretasen citoquinas etc y causaran rechazo del órgano.

4.2. Rechazo mediado por anticuerpos (AMR)

El injerto hepático se ha considerado más resistente al rechazo mediado por anticuerpos que otros órganos. El AMR se manifiesta de dos maneras: una severa (rechazo hiperagudo) causada por anticuerpos preformados frente al donante en caso de incompatibilidad ABO, y una menos severa (rechazo agudo) causada principalmente por anticuerpos frente a otras especificidades del donante (anticuerpos citotóxicos anti-HLA y anti-endotelio).

El rechazo hiperagudo se produce por la incompatibilidad ABO entre donante y receptor y la presencia de anticuerpos preformados en éste. Se presenta como una disfunción severa del injerto en las primeras dos semanas tras el trasplante, a diferencia de los signos de rechazo hiperagudo del trasplante renal que se manifiestan a los pocos minutos de la reperfusión del órgano. Tras un período de latencia de horas o incluso días en los que la función del injerto parece normal, aparece un incremento rápido de transaminasas en suero y del tiempo de protrombina, asociado a signos de fallo hepático agudo. Los hallazgos histopatológicos se caracterizan principalmente por el daño

endotelial y trombosis microvascular que derivan en hemorragia masiva y necrosis de los hepatocitos.

El rechazo agudo mediado por anticuerpos se describió por primera vez en el contexto de injertos ABO compatibles con anticuerpos citotóxicos preformados. El papel de los anticuerpos anti-HLA donante específicos (preformados o de novo) ha sido ampliamente discutido en el pasado, sin embargo recientemente, además de demostrarse su importancia en la patogénesis del AMR, se han asociado a una mayor frecuencia y severidad de rechazo agudo, a una mayor progresión hacia rechazo crónico y a una reducción de la supervivencia del injerto y el paciente (107, 108).

Los hallazgos histopatológicos del AMR se solapan con los cambios producidos por el daño de preservación-reperfusión, rechazo celular agudo, obstrucción biliar y daño isquémico, lo que hace que su diagnóstico no pueda realizarse basándose exclusivamente en ellos. En 2003 se fijaron los criterios diagnósticos para el AMR en el trasplante de órgano sólido, estableciendo cuatro aspectos principales: evidencia clínica de disfunción del injerto, evidencia histológica compatible con daño del tejido, evidencia inmunopatológica del daño por anticuerpos (depósitos de C4d) y evidencia de presencia de anticuerpos anti-HLA u otros anticuerpos donante-específicos. Si bien estos criterios han sido ampliamente aceptados para el diagnóstico de AMR en el trasplante renal y cardiaco, no ha sido así en el caso del trasplante hepático. En el caso de la detección de depósitos de C4d, la positividad para este marcador apenas tiene valor diagnóstico, particularmente si el patrón es focal y los hallazgos histológicos son compatibles con otros diagnósticos. Sin embargo con una clínica sugestiva de AMR, la presencia de positividad difusa de C4d (en más del 50% de los espacios porta o los sinusoides) apoya el diagnóstico e indica la presencia de anticuerpos anti-HLA donante

específicos. Por otro lado, una biopsia con signos de AMR pero negativa para C4d, ayuda a excluir el diagnóstico de AMR (109).

4.2.2 Papel de los anticuerpos en el trasplante

El impacto que tienen los anticuerpos en el trasplante depende de varios factores incluidos: la revascularización del aloinjerto, el tipo de anticuerpo, la concentración de anticuerpo y la densidad del antígeno diana. Históricamente los anticuerpos se han asociado con efectos nocivos para el órgano trasplantado, sin embargo también pueden suprimir la respuesta inmune y jugar un papel protector del aloinjerto (110).

4.2.2.1 Efectos nocivos de los anticuerpos

El complemento es un conjunto de proteínas, del sistema inmune innato, producidas en el hígado que existen de forma inactiva en el plasma y el líquido intersticial. Su activación desencadena una cascada de reacciones biológicas (lisis celular, inflamación, opsonización de patógenos) cuyo objetivo es la eliminación de antígenos extraños. El complemento consta de tres vías de activación: la vía clásica, alternativa o mediada por lectinas (111). Aunque dependen de diferentes moléculas para su iniciación convergen en la misma fase terminal (lítica) con la producción de la C3 convertasa y la activación del factor C3 que posteriormente va generar las mismas células efectoras en las tres vías; el complejo de ataque a membranas (MAC; membrane attack complex) que provoca lisis del patógeno (112).

La vía clásica, se activa mediante la unión de antígenos a anticuerpos por lo que juega un papel relevante en el trasplante. En un estudio multicéntrico de 1016 trasplantados renales, se observó que la tasa de rechazo mediado por anticuerpos, el

daño al aloinjerto, el grado de inflamación microvascular y el depósito capilar de C4d era mayor en aquellos pacientes con anticuerpos anti-HLA donante específicos y activadores de la cascada del complemento (113) en comparación con pacientes sin anticuerpos.

En el hígado la vía alternativa del complemento también juega un papel en el trasplante. Durante el proceso de isquemia-reperfusión, la liberación de proteínas intracelulares en el periodo de perfusión activa los receptores de complemento en las células Kupffer. Estas se activan y desencadenan una reacción en cascada que causa inflamación por la quimiotaxis de neutrófilos a la zona afectada, un incremento en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y de adherencia de neutrófilos, y una producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) que dañan el injerto hepático (114, 115). De este modo, el complemento también puede causar daño en el contexto del trasplante hepático aunque no esté mediado por anticuerpos.

4.2.2.2 Efectos beneficiosos de los anticuerpos

Además de tener un efecto patogénico, los anticuerpos también pueden tener una función protectora. La “acomodación” inmunológica es un fenómeno por el cual un receptor de órgano puede tener anticuerpos contra su aloinjerto pero estos no solo no son patogénicos sino que en ocasiones además pueden ser protectores (116, 117). Originalmente descrito en trasplantes ABO incompatibles (118), a posteriori se ha descrito también en pacientes alosensitivos (119) y en xenotrasplantes (120).

Aunque este proceso biológico no se conoce del todo, varios estudios sugieren que puede ser el resultado de tres mecanismos de resistencia que generan un cambio en

las propiedades del anticuerpo o del antígeno, la regulación al alza de genes anti-apoptóticos o factores reguladores del complemento.

En un modelo de trasplante cardíaco murino (121) un cambio de isotipo de anticuerpos fijadores de complemento por anticuerpos no-fijadores de complemento demostraron tener un efecto benéfico. En pacientes con hepatitis autoinmune de novo post TOH, la generación de anticuerpos IgG4 “protectores” y no fijadores del complemento también resultó en una mejor función hepática, aunque el grado de fibrosis y actividad necroinflamatoria del aloinjerto fue mayor en estos pacientes (122). Asimismo, el cambio en las propiedades del antígeno de unión (123) puede tener un efecto protector.

Otro mecanismo que podría explicar el fenómeno de acomodación inmunológica es la regulación al alza (up-regulation) de determinados genes: hemi-oxigenasa 1 (HO-1), Bcl-2, A20 y Bcl-xl (117). La HO-1 es un anti-oxidante que en modelos murinos de trasplante ha demostrado reducir la progresión de la arteriosclerosis, característica del rechazo crónico del injerto. Los genes Bcl-2, A20 y Bcl-xl son genes anti-apoptóticos que además de suprimir la muerte celular programada, también inhiben la activación endotelial con lo que se reduce el riesgo de daño.

Finalmente, la regulación de la cascada del complemento también consigue minimizar (o evitar) daños al endotelio. La resistencia al complemento se consigue mediante una combinación de factores: la expresión de proteínas reguladoras del complemento como la CD59 (Protectina), una proteína inhibidora del complejo de ataque a membrana (MAC-IP; membrane attack complex inhibitory protein) que se expresa en leucocitos, eritrocitos, células endoteliales y epiteliales que protege las células del daño ocasionado por el complemento (124). También mediante la

modificación del metabolismo celular que consigue que las células sean capaces de resistir la lisis del complemento de forma intrínseca (125) o bien mediante la internalización o el desprendimiento de complejos terminales del complemento (126).

En resumen, aunque la presencia de anticuerpos es el índice de inmunidad humoral más específico y sensible en el trasplante su ausencia en el suero no es sinónimo con ausencia de inmunidad humoral. En muchas ocasiones se diagnostica el rechazo humoral basándose en la presencia de complemento y anticuerpo fijado en los tejidos aun en su ausencia en suero. Tampoco la presencia de anticuerpos anti-aloinjerto constituye una prueba inequívoca de rechazo humoral temprano ya que el injerto tiene una gran capacidad de absorción de anticuerpos y un pico de anticuerpos en suero podría señalar la evolución de un rechazo tardío. Tampoco, todos los anticuerpos en suero son hostiles o patogénicos, un determinado tipo de anticuerpo o un cierto título de anticuerpo puede suprimir la inmunidad y/o proteger el aloinjerto, por lo que en ausencia de un empeoramiento de la función del aloinjerto y/o evidencia patológica del mismo es importante valorar el uso de terapias intrusivas en el paciente (110).

Además del papel que juegan los linfocitos B y los anticuerpos en la inmunidad humoral y en el trasplante, los linfocitos T desempeñan una función central en la activación de linfocitos B. Además forman el eje de la inmunidad celular ya que reconocen antígeno extraño procesado y presentado por células presentadoras de antígeno.

4.3 Rechazo agudo celular

El rechazo agudo celular aparece en las primeras semanas tras el trasplante (el 60% de los casos se da en las primeras 6 semanas) y habitualmente responde al aumento de la inmunosupresión acompañado de bolos de corticosteroides. Existe también una forma de presentación tardía (entre el primer y el sexto mes post-trasplante), que tiene una incidencia del 7-23% y que se caracteriza por un infiltrado portal inflamatorio de células mononucleares (a diferencia del infiltrado mixto que aparece en la forma temprana), inflamación menos severa de los conductos biliares y las vénulas portales y mayor tendencia al desarrollo de hepatitis. Además se asocia con peor pronóstico y es más refractaria al tratamiento.

Con respecto a la histología del rechazo agudo, el sistema Banff (Banff working group) (127-129) consta de dos componentes, una valoración global (Global assessment- Tabla I4) que cuantifica el grado y la intensidad del proceso necroinflamatorio del hígado y una valoración semicuantitativa denominada índice de actividad del rechazo agudo (rejection activity index (RAI score- Tabla I5)) que valora las 3 principales características histológicas del rechazo: 1) inflamación portal con infiltración de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos 2) inflamación o destrucción de los conductos biliares y 3) inflamación subendotelial de las venas porta o vénulas hepáticas terminales. Cada uno de éstos componentes recibe una puntuación (RAI score) entre 1 y 3. Un diagnóstico de rechazo agudo requiere que por lo menos dos de las tres características descritas estén presentes en el aloinjerto (Figura I9).

Tabla I4. Gradación del rechazo agudo (global assessment) (127)

Valoración Global	Criterio
Indeterminado	Infiltrado inflamatorio que no cumple los requisitos para el diagnóstico de rechazo agudo.
Leve (Grado I)	Infiltrado inflamatorio en una minoría de las triadas portales que es leve y se limita a los mismos.
Moderado (Grado II)	Infiltrado inflamatorio que se extiende a la mayoría de las triadas portales
Severo (Grado III)	Infiltrado de rechazo como en el grado II, que se extiende a las áreas periportales y/o inflamación perivena centrolobulillar moderada a severa asociada a necrosis hepatocitaria perivena centrolobulillar

Tabla I5. Índice de la actividad del rechazo agudo (RAI score) (127)

Categoría	Criterio	Puntuación
Inflamación portal	Infiltrado inflamatorio predominantemente linfocitario que afecta a una minoría de los espacios porta y que no los expande.	1
	Expansión de la mayoría o de todos los espacios porta por un infiltrado mixto que incluye linfocitos con ocasionales blastos, neutrófilos y eosinófilos.	2
	Expansión marcada de la mayoría o de todos los espacios porta por un infiltrado mixto que incluye numerosos blastos y eosinófilos y, con extensión del infiltrado al área periportal.	3
Lesión inflamatoria de los conductos biliares	Una minoría de los conductos están infiltrados por células inflamatorias y muestran únicamente cambios reactivos como un aumento de la relación núcleo-citoplasmática de las células epiteliales.	1
	La mayoría o todos los conductos están infiltrados por células inflamatorias. En más de un ocasional conducto se identifican cambios degenerativos como pleomorfismo nuclear, polaridad alterada y vacuolización citoplasmática del epitelio.	2
	Como en el apartado 2, pero la mayoría o todos los conductos muestran cambios degenerativos o disrupción luminal focal.	3
Inflamación endotelial venosa	Infiltrado linfocítico subendotelial que afecta algunos, pero no la mayoría de las vénulas portales y/o centrolobulillares.	1
	Infiltrado subendotelial que afecta la mayoría o todas las vénulas portales y/o centrolobulillares.	2
	Como en el apartado 2, con una inflamación perivenular moderada o severa que se extiende al parénquima perivenular y se asocia a necrosis hepatocitaria perivenular.	3

4.4 Rechazo crónico

El rechazo crónico se caracteriza principalmente por la pérdida progresiva de los conductos biliares, arteriopatía obliterativa y colestasis reflejada en el incremento sérico

de los niveles de fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa (GGT) y bilirrubina. Puede manifestarse dentro de los primeros 12 meses post-trasplante, aunque gracias a las mejoras en las terapias inmunosupresoras cada vez aparece de manera más tardía y con menos incidencia (1-2%). En muchas ocasiones el curso del rechazo crónico resulta indolente pudiendo pasar años sin progresar hacia el fallo del injerto. A diferencia de otros órganos, el rechazo celular en el trasplante hepático es potencialmente reversible. Esta capacidad se ha atribuido generalmente a las propiedades inmunológicas del hígado y a las posibilidades regenerativas de la principal diana del rechazo crónico, los conductos biliares (130).

El rechazo crónico suele estar precedido de uno o más episodios de rechazo agudo celular, que se hacen resistentes a la terapia inmunosupresora. El daño de los conductos biliares en las etapas iniciales se caracteriza por un infiltrado linfocítico en el epitelio biliar y cambios degenerativos en los conductos. El efecto citotóxico de los linfocitos sobre las células epiteliales se debe principalmente a la expresión en las células epiteliales de antígenos HLA de clase I de manera constitutiva y la de HLA de clase II durante los procesos de inflamación y rechazo.

Desde el punto de vista histopatológico, el rechazo crónico puede clasificarse en temprano o tardío (127). En la etapa inicial, el rechazo crónico se caracteriza por cambios histológicos que afectan a la mayoría de los conductos biliares: 1) cambios degenerativos incluyendo transformación eosinofílica del citoplasma, aumento de la relación núcleo-citoplasmática, hipercromasia nuclear, distancia desigual entre los núcleos, ductos parcialmente tapizados por células epiteliales y 2) ductopenia en < 50% de los espacios porta. Los cambios en las vénulas centrolobulillares y hepatocitos

perivenulares principales son: 1) inflamación de la íntima o del lumen, 2) inflamación y necrosis perivena centrolobulillar y 3) fibrosis leve perivena centrolobulillar.

Finalmente los cambios histológicos característicos de las ramas de la arteria hepática incluyen una pérdida arteriolar de $<25\%$ de los espacios porta y una arteriopatía xantomatosa en las arterias hepáticas grandes perihiliares que no compromete la luz vascular (127).

Los criterios histológicos para diagnosticar un rechazo crónico tardío son: en los conductos biliares de los espacios porta interlobulillares: 1) cambios degenerativos en los conductos biliares residuales y una ductopenia más pronunciada que se observa en $>50\%$ espacios porta. Los cambios en las vénulas centrolobulillares y hepatocitos perivenulares incluyen una obliteración focal con inflamación variable y fibrosis severa (puentes-bridging fibrosis). Finalmente los cambios en las ramas de la arteria hepática incluyen una pérdida arteriolar en $>25\%$ de los espacios porta, una arteriopatía xantomatosa en las arterias grandes perihiliares que ocluye la luz y proliferación fibrointimal (127) (Figura I9).

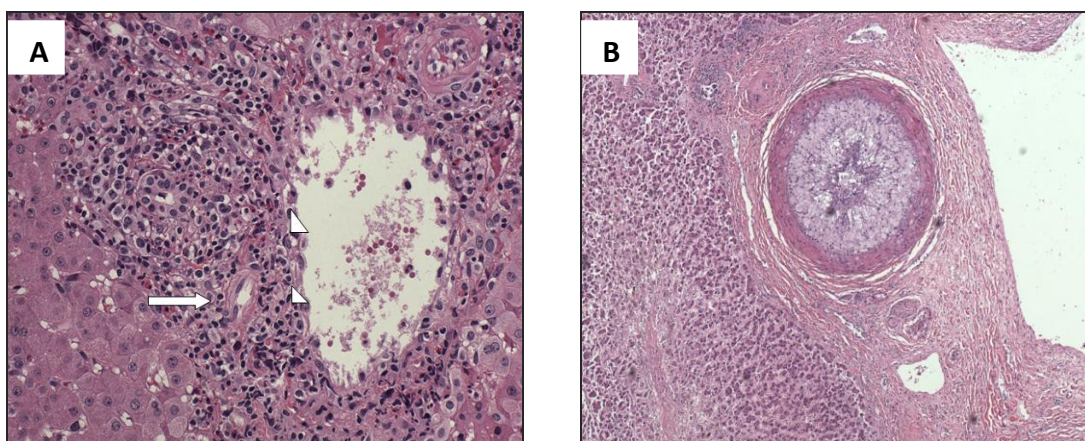


Figura I9. Patología de rechazo hepático. A. Rechazo agudo con endotelitis (triángulos) y destrucción del conducto biliar (flecha) con inflamación portal mixta (40x) B) Arteriopatía de células “espumosas” observada en rechazo crónico (Adaptado de Limaye (131))

5. Sistemas antigénicos HLA y MICA

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un conjunto de genes que codifican proteínas de superficie involucradas en la respuesta inmune. En el humano recibe el nombre de sistema HLA (del inglés Human Leucocyte Antigen) y las proteínas que codifica se denominan “moléculas HLA” o “antígenos HLA”. Su función primordial es la presentación antigénica (132-134).

El sistema HLA se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma seis en la banda 21.3. Esta región de aproximadamente 3,600 kilobases de ADN, está constituida por más de 200 genes, 40 de los cuales codifican antígenos leucocitarios. Los genes HLA se dividen en tres grupos o regiones: clase I, clase II y clase III (figura I10).

Dentro de los genes HLA de clase I, se encuentran los genes clásicos (ó Ia) HLA-A, HLA-B y HLA-C que codifican glicoproteínas de membrana que se expresan en la mayoría de células nucleadas del organismo. Los genes HLA de clase I “no clásicos” ó Ib, lo componen los antígenos HLA-E, HLA-F y HLA-G. Dentro de este grupo también se encuentran los genes de MICA y MICB (estos últimos, serán descritos en la sección 5.5). Su estructura es homóloga a la de los genes HLA de clase I “clásicos” con una cadena pesada alfa de 3 dominios asociados covalentemente con la cadena ligera (β 2 microglobulina). Sin embargo, a diferencia de los genes “clásicos”, éstos son de un polimorfismo limitado, tienen una distribución y expresión celular y tisular disminuida (HLA-G y -F) (135, 136) y, aunque algunos estudios han demostrado que juegan un rol en la respuesta adquirida a bacterias y virus, su función esta predominantemente asociada a la regulación de la inmunidad innata (137).

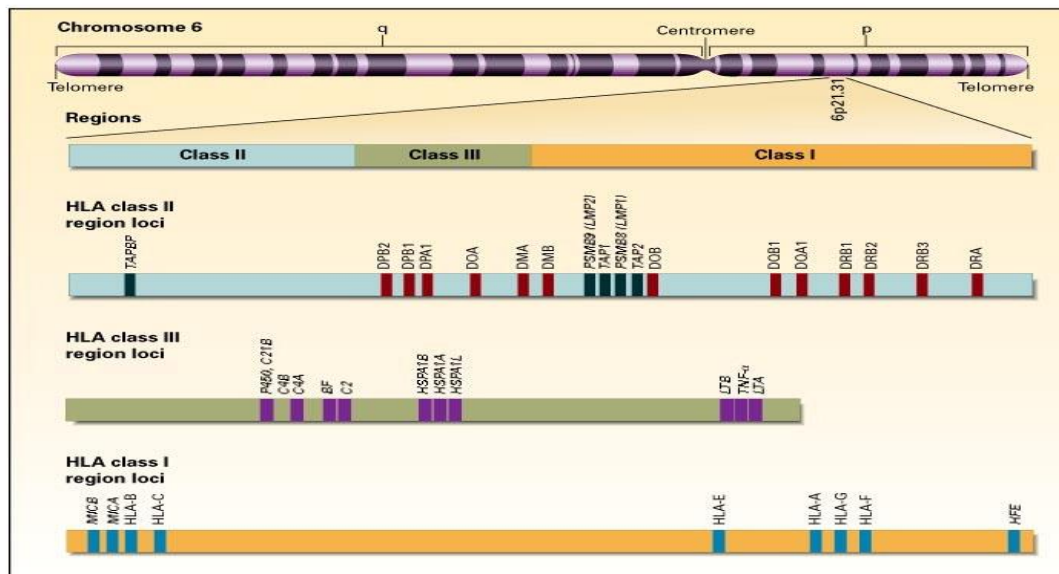


Figura I10. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6. (Adaptado de Klein (133))

5.1 Genes y moléculas HLA de clase I

Los genes HLA de clase I constituyen la región más telomérica del sistema HLA y abarcan una región genómica de 1,600 kb. Los genes HLA de clase I comprenden seis subgrupos de genes divididos en dos categorías: genes “HLA clásicos” y genes “HLA no clásicos”.

Un gen clásico de HLA consta de 8 exones que incluyen: el primer exón que es el péptido señal, los exones 2, 3 y 4 que codifican los dominios extracelulares $\alpha 1, \alpha 2$ y $\alpha 3$, el exón 5 que codifica la región transmembrana y los exones 6, 7 y 8 que codifican la región citoplasmática (Figura I11).

Las moléculas HLA I son glicoproteínas heterodiméricas que constan de una cadena pesada (subunidad α) de 45kDa codificada por genes HLA y una cadena ligera (subunidad $\beta 2$) de 12kDa codificada por genes localizados en el cromosoma 15 que no pertenecen al sistema HLA ($\beta 2$ microglobulina). La subunidad α

previamente descrita está constituida por 350 aminoácidos, y se divide en tres regiones funcionales: región extracelular, transmembrana y citoplasmática.

La región extracelular de la cadena pesada se pliega en tres dominios globulares: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Cada dominio de aproximadamente 90 aminoácidos es codificado por un exón diferente. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, que son altamente polimórficos, forman una estructura tridimensional denominada sitio de unión al péptido (peptide binding groove). En las moléculas HLA de clase I esta estructura, análoga a una valva o hendidura, acomoda péptidos de entre 8-10 aminoácidos para su presentación a los linfocitos T y en el caso de las moléculas HLA de clase II acomoda entre 7-15 aminoácidos. El sitio de unión al péptido consta de dos partes, un segmento inferior formado por una lamina plegada β que constituye la base y dos segmentos laterales formados por las α hélices de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ a modo de “pared” de la valva. El dominio $\alpha 3$, más conservado que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, se pliega en forma de bucle para formar un dominio Ig que sirve como ligando de la molécula CD8.

La $\beta 2$ microglobulina es una proteína no polimórfica que estabiliza la molécula HLA para que adopte la estructura terciaria adecuada. Esta molécula es de unos 100aa de largo, de estructura de dominio de Igs que se mantiene unida a la cadena pesada vía su interacción con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (138, 139).

5.2 Genes y moléculas HLA de clase II

La molécula HLA II consta de una cadena α y una cadena β . El gen HLA II para la cadena α consta de 5 exones: el exón 1 codifica la secuencia líder, la secuencia señal y los primeros 5aa de la proteína. Los exones 2 y 3 codifican los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, el exón 4 codifica el péptido de conexión, la región transmembrana y citoplasmática, y el

exón 5 codifica la región 3' no transcrita (UT). La estructura del gen de la cadena β es muy similar excepto el dominio citoplasmático que contiene 2 ó 3 exones codificantes.

La región HLA II se divide en las subregiones: HLA-DR, -DQ y -DP. La subregión HLA-DR contiene un gen que codifica la cadena HLA-DR, 5 genes para la cadena β (HLA-DRB1-5) y 4 pseudogenes (HLA-DRB6-9). La subregión HLA-DQ y -DP constan cada una de ellas de 2 genes para las cadenas α y 2 para las cadenas β de modo que el producto de los genes HLA-DQA1 y DQB1 se asocian para formar el antígeno HLA-DQ y los HLA-DPA1 y DPB1 forman los antígenos HLA-DP.

Las moléculas HLA II son glicoproteínas de membrana tipo I que constan de un heterodímero formado por una cadena α de 31-34kDa y una β de 26-29kDa (Figura I11). Cada cadena consta de una región citoplásmica, transmembrana y extracitoplásmica. Los dominios extracelulares más distales son $\alpha 1$ y $\beta 1$ que forman la unión al péptido, y los más cercanos a la membrana $\alpha 2$ y $\beta 2$ forman una estructura tridimensional similar a la de las moléculas de HLA I.

El bolsillo de unión al péptido está formado por una base (formada por 8 plegamientos en hoja β : cuatro procedentes de $\alpha 1$ y cuatro de $\beta 1$) y dos plegamientos que flanquean el bolsillo (formado por una cadena α y otra β) .

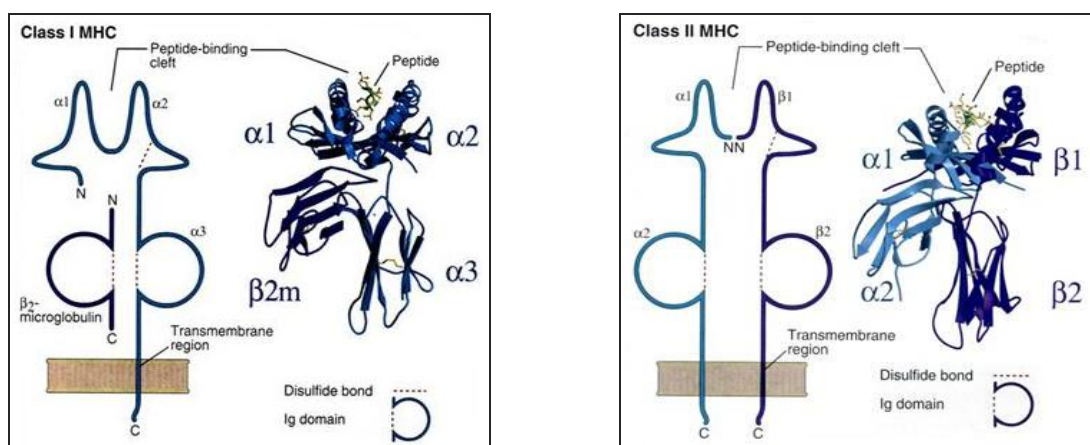


Figura I11. Moléculas MHC de clase I y clase II

5.3 Función de las Moléculas HLA (ó MHC)

El papel biológico de las moléculas MHC es el de presentar péptidos extraños a los linfocitos T. Las moléculas de HLA (MHC) presentan péptidos de proteínas de diferente procedencia (exógena o endógena), de diversos patógenos a subpoblaciones linfocitarias distintas (140).

Los linfocitos CD8 reconocen péptido adherido a moléculas MHC I mediante su unión al dominio $\alpha 3$, mientras que los linfocitos CD4 reconocen antígeno adherido a moléculas MHC II mediante su unión al dominio $\beta 2$ de la molécula de MHC. Los linfocitos T sólo se activan cuando se les presenta péptido extraño mediante moléculas MHC ya que los linfocitos T cuyo TCR reconoce antígeno propios suelen ser eliminados o inactivados en el timo en etapas tempranas de su desarrollo (141).

5.4 Expresión de antígenos HLA

Aunque su grado de expresión varía de tejido a tejido dependiendo de la secreción de citocinas y linfoquinas, la mayoría de las células somáticas (todas las células nucleadas) en el hombre expresan moléculas HLA I.

La expresión de antígenos HLA II, sin embargo, es más limitada expresándose constitutivamente solo en un grupo de células especializadas: células presentadoras de antígeno (APC), linfocitos B, macrófagos y monocitos. También se expresan en determinados endotelios vasculares, epitelios ductales (senos y tracto gastrointestinal) y glomérulo del riñón. Dentro de los antígenos HLA II también se observa una diferencia cuantitativa entre las diferentes moléculas HLA II: ya que por ejemplo los antígenos HLA-DR existen en mayor cantidad que los antígenos HLA-DQ y DP. A pesar de su expresión restringida, la secreción de citocinas puede causar una regulación al alza de

estos antígenos. Además en situaciones de rechazo inmunológico o tolerancia su expresión puede variar (65).

En el hígado normal, la expresión de antígenos HLA es baja. Los componentes más antigénicos son los linfocitos, las células dendríticas y las células Kupffer. Otras células hepáticas también expresan moléculas HLA pero débilmente, incluyen: hepatocitos, endotelio vascular y epitelio de los conductos biliares.

En situaciones patológicas o con el rechazo del aloinjerto la expresión de antígenos HLA I y II se puede ver aumentada, especialmente en el epitelio biliar y el endotelio vascular. (Tabla I6).

Tabla I6. Expresión de antígenos HLA en el hígado (65)

Células	HLA I		HLA II	
	Normal	Rechazo	Normal	Rechazo
Hepatocitos	±	+	-	+
Células Epitelio biliar	-	+++	-	+++
Células de Kupffer	±	+	+	++
Células Dendríticas	±	+	+	++
Células Endoteliales sinusoidales	±	+	-	++

5.5 Genes y moléculas MICA

Los genes MIC (Mayor Histocompatibility Class I chain related genes) son un grupo de genes polimórficos de la familia de moléculas MHC de clase I no clásicas, que codifican proteínas de superficie inducidas por el estrés celular. La familia consiste de dos genes funcionales, MICA y MICB, y cinco pseudogenes (MICC-MICG) (142)

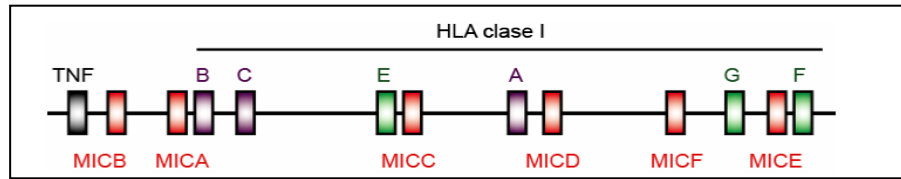


Figura I12. Localización de los genes MIC en la región de clase I de HLA. En la figura aparecen los genes de las moléculas de clase I: HLA-A,-B,-C,-E,-F y -G además de los dos genes MIC (MICA y MICB) y 4 de los pseudogenes (MICC-MICF) (143).

El gen MICA está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la región centromérica de MHC de clase I, a 46.5 kb del locus de HLA-B con el cual presenta desequilibrio de unión (Figura I12). Las regiones del dominio extracelular de la molécula comparten entre el 15-36% de homología con el MHC clásico de clase I (144). El gen consiste de 6 exones separados por 5 intrones que se transcriben en un RNAm de 1382pb y que da lugar a un polipéptido de 383 aminoácidos y 43kDa.

Al igual que las moléculas clásicas de clase I, la estructura de MICA consiste de tres dominios extracelulares $\alpha 1$ (codificado por el exón 2) $\alpha 2$ (exón 3) $\alpha 3$ (exón 4), una región transmembrana (exón 5) y un tallo citoplasmático (exón 6). A pesar de sus similitudes estructurales con moléculas de clase I, MICA se diferencia en que no se une a la $\beta 2$ microglobulina, y que no depende de proteínas TAP (transport associated proteins), sugiriendo que su función es independiente de la unión a péptidos (142, 144).

Similar a las moléculas de clase I clásicas, MICA exhibe un alto grado de polimorfismo. Existen varias posiciones polimórficas en los exones 2 a 4 del gen que codifican los dominios extracelulares de la molécula. Los 70 alelos descritos del gen (IMGT/HLA database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) parecen dividirse en dos grupos parafiléticos, LI y LII, basados en el polimorfismo del exón 4 que codifica el dominio extracelular $\alpha 3$. Esta posible evolución de los genes MIC podría explicar las frecuencias de variantes alélicas que se observan en diferentes poblaciones. Los alelos MICA LII, MICA*008 y MICA*009, son más frecuentes en población japonesa, coreana,

tailandesa, galesa, brasileña, americana de origen europeo y marroquí mientras que el alelo MICA*002 de la familia MICA LI se asocia a población amerindia (142).

En un estudio de 154 individuos españoles en la región de Murcia, se observó que más del 56% de los alelos MICA estudiados correspondían a MICA*008, MICA*004 y MICA*002 tradicionalmente asociados a población caucásica y a poblaciones del norte de África. La diversidad alélica de MICA podría afectar la región de unión de MICA a su ligando, desempeñando un papel en la posterior activación de células NK y la modulación de células T (145).

5.6 Función de MICA

La molécula MICA es un ligando para las células NK, $\gamma\delta$ T, y $\alpha\beta$ CD8 que expresan el receptor activador NKG2D (natural killer group 2 member D) (146). Este receptor es una lectina tipo C (transmembrana tipo II) que forma homodímeros unidos por puentes disulfido en la superficie celular. Está codificado por el gen KLRK1 (killer cell lectin-like receptor subfamily member 1) localizado en el cromosoma 12 humano, y aunque existe en dos isoformas diferentes en ratones (NKG2DS y NKG2DL) en humanos sólo existe en su forma NKG2DL (long). La isoforma NKG2D-L tiene un dominio intracelular largo que se asocia a la proteína adaptadora transductora de señales DAP 10 (DNAX adaptor protein of 10kDa) (147). La interacción de NKG2D con su ligando, inicia el proceso de señalización al interior de la célula induciendo la fosforilación del motivo citoplasmático ITIM (tyrosine based inhibition motif) de la proteína adaptadora DAP10 que activa la cascada de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) y de la proteína GrB2 (proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento).

El receptor NKG2D reconoce varios ligandos que se expresan en situaciones de estrés celular o infecciones (ej: MICA/MICB e ULBPs). Además de su rol en la vigilancia inmunológica antitumoral, varios estudios señalan la importancia de NKG2D y sus ligandos en el trasplante (144).

5.7 Función de MICA y NKG2D en el trasplante

En el aloinjerto, la unión del antígeno MICA con el ligando NKG2D puede tener efectos paradójicos contribuyendo tanto al rechazo del órgano sólido, como a la inducción de tolerancia. Estos efectos antagónicos están mediados en parte por la isoforma de la proteína MICA, expresada adherida a la membrana celular o bien en forma soluble (142).

La activación de NKG2D tras su unión con el antígeno MICA (expresado en la superficie de la membrana) activa la célula NK. Esta activación induce la co-estimulación de células T que favorece la citotoxicidad antígeno-específica mediada por linfocitos citotóxicos, así como la producción de anticuerpos anti-MICA (148).

Para investigar si el antígeno MICA expresado en membrana participaba en el rechazo del aloinjerto, Zou y col (149) evaluaron la citólisis de células HeLa con expresión del antígeno MICA*008 al ser incubadas con anticuerpos mAb3.2H3 (anti-MICA) en presencia de complemento. Estos cultivos celulares presentaban una mortalidad de hasta el 100% de sus células en presencia de anticuerpos anti-HLA y anticuerpos anti-MICA, y hasta el 70% en presencia de anticuerpos anti-MICA exclusivamente. Los investigadores concluyeron que aquellos receptores que formaban anticuerpos anti-MICA contra las células del injerto donante tenían más riesgo de rechazo.

El significado de los anticuerpos anti-MICA se ha estudiado sobre todo en el trasplante renal. Sumitran-Holgersson y colaboradores (150) fueron de los primeros en describir una correlación clínicamente significativa entre la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados y complicaciones inmunológicas tempranas incluyendo pérdida del injerto renal. Observaron que aquellos pacientes con títulos elevados de anticuerpos anti-MICA tenían más índice de rechazo, aún en la ausencia de anticuerpos HLA donante-específicos. También observaron que la incubación del suero de pacientes con trombosis vascular y títulos elevados de anticuerpos anti-MICA con células endoteliales microvasculares del riñón inducía un fenotipo protrombótico en la célula endotelial. En estos cultivos celulares tanto los anticuerpos monoclonales anti-MICA como el suero de pacientes con anticuerpos anti-MICA causaba un aumento en la expresión de tromboquinasa, necesaria para la formación de trombina, así como un incremento del inhibidor activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Ambos factores influyen en el riesgo de trombosis vascular y podrían contribuir a la pérdida del injerto.

En posteriores estudios multicéntricos, se evaluó la correlación entre anticuerpos MICA pre-trasplante y supervivencia del injerto en 1910 trasplantes renales (151). Los resultados confirmaron que aquellos pacientes que tenían anticuerpos anti-MICA pre-trasplante (11.4%), a pesar de tener un grado alto de compatibilidad HLA con su donante, evolucionaban menos favorablemente que aquellos pacientes sin anticuerpos MICA. El significado de estos anticuerpos en trasplante hepático es desconocido.

5.8 MICA soluble (sMICA)

Además de su expresión en membrana celular, MICA también puede existir en forma soluble. A diferencia de la primera isoforma que al unirse con su ligando NKG2D tiene efectos activadores, la isoforma soluble induce tolerancia al unirse a su ligando.

La isoforma soluble de MICA se genera cuando el dominio $\alpha 3$ forma un complejo con la proteína ERp5 causando un cambio conformacional en la molécula. Como resultado de esta unión, parte de la molécula MICA queda expuesta al grupo de proteasas ADAM (proteínas que contienen desintegrina A y un dominio de metaloproteinasas A) que escinden la molécula de la superficie celular en un proceso denominado “shedding”. La molécula MICA escindida de la membrana celular, ahora denominada MICA soluble (sMICA), se une a su ligando NKG2D y éste induce la internalización y degradación del receptor y a su vez estimula la expansión de células inmunosupresoras T, NKG2D+CD4+ (142) (Figura I13).

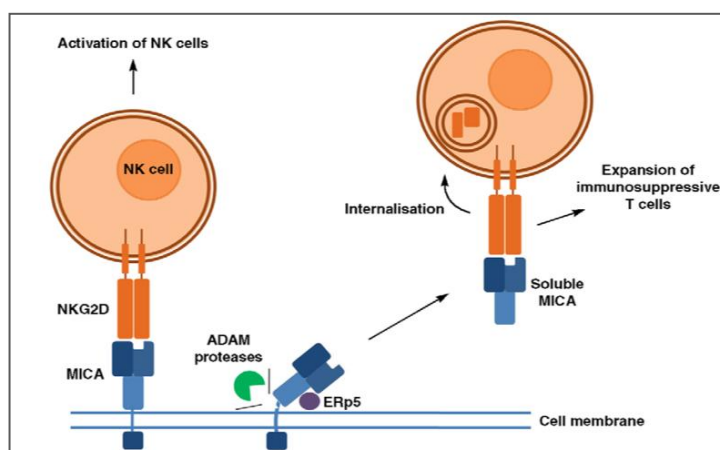


Figura I13. Mecanismo de acción de MICA. A) Activación de la célula NK mediante su unión al ligando MICA adherido a la membrana celular. B) Mecanismo de “shedding” de MICA (MICA soluble, sMICA). La isoforma soluble de MICA es escindida de la superficie del aloinjerto por metaloproteinasas y la proteína citoplasmática ERp5. Esta isoforma soluble causa endocitosis y degradación del receptor NKG2D en células CD8+, T y NK que inhiben la respuesta citolítica y contribuyen a la aceptación del órgano trasplantado (Adaptado de Choy (142)).

5.9 Expresión de antígenos MICA

MICA exhibe una expresión tisular limitada a diferencia de la expresión ubicua de moléculas HLA I. Se expresa de forma constitutiva en la superficie celular del epitelio gastrointestinal, células endoteliales y fibroblastos, pero no en células del linaje

linfohematopoyético (linfocitos B, linfocitos T o monocitos) (152, 153). También se ha descrito su expresión en el timo tanto en la corteza donde se acumulan linfocitos inmaduros como en la médula (corpúsculos de Hassall) poblada por linfocitos maduros. Los corpúsculos de Hassall forman parte de una estructura reticuloendotelial donde se crea el microambiente de señales paracrinas y yuxtacrinas necesarias para el correcto desarrollo funcional del timocito. La expresión de MICA en zonas de linfopoyesis sugiere que podría jugar un papel en la selección y maduración de linfocitos T (153, 154).

A pesar de su expresión restringida en la superficie de la célula, varias líneas celulares expresan RNAm o proteína MIC en su núcleo o citoplasma, y se han detectado transcritos de MIC en todos los órganos principales con excepción del cerebro (152).

A diferencia de las moléculas MHC de clase I, la expresión de MICA no está modulada por IFN γ . La expresión de esta molécula en superficie es inducible por el estrés celular. El estrés oxidativo provoca daño a la célula mediante la alteración de moléculas diana (proteínas, lípidos y ADN) y la inducción de apoptosis celular. La proteína de choque térmico HSP70 (heat shock protein 70) que aumenta el estrés oxidativo, incrementa tanto la expresión del gen MICA y los niveles de la proteína, como la respuesta de los CTL's (linfocitos T citotóxicos) y las NK dirigida a células diana (153, 155). Yamamoto y col (156) observaron que líneas celulares de carcinoma de colon humano (CaC0-2) incubadas durante dos días con H₂O₂ o HSP70 incrementaban la expresión en superficie de MICA y MICB.

MICA y MICB también desarrollan un papel en la inmunidad tumoral, y su expresión se ha detectado en varios tumores de origen epitelial como en el carcinoma de mama, colon, riñón, ovario, pulmón y próstata. Raramente se expresan en leucemias de células T o linfomas B (157).

Debido a su expresión en superficie endotelial, MICA también podría actuar como diana durante la respuesta humoral y celular en el rechazo de un injerto. El endotelio vascular actúa como la primera barrera inmunológica entre el receptor y el injerto del donante, y por tanto sufre el mayor impacto de la respuesta inmune. Hankey y col (158) demostraron que en pacientes trasplantados de riñón o de páncreas, aquellos que presentaban evidencia histológica de rechazo o daño celular tenían un aumento de la expresión de MICA en el epitelio tubular, los túbulos proximales y distales o en los acinos e islotes pancreáticos respectivamente. Los autores postulan que la expresión de MICA podría preceder a la infiltración celular. Asimismo, varios estudios en diferentes órganos sólidos han demostrado que aquellos pacientes que tienen una incidencia mayor de rechazo también tienen anticuerpos anti-MICA en suero en comparación con los pacientes que tienen un menor índice de rechazo o pérdida del injerto.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La incompatibilidad antigénica entre donante y receptor y la alorespuesta inmunológica de carácter humoral están asociadas a una predisposición al rechazo inmunológico y pérdida del injerto a largo plazo en trasplantes de órgano sólido como riñón y corazón.

En base a las observaciones de las primeras etapas del trasplante hepático clínico, el hígado siempre se ha considerado un órgano “privilegiado” en este respecto. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas técnicas inmunológicas de detección de antígenos y anticuerpos en años recientes, que proporcionan información adicional respecto a las técnicas clásicas, se ha cuestionado que el injerto hepático esté completamente exento de sufrir daño mediado por factores inmunológicos humorales.

La hipótesis que se plantea aquí sostiene que, debido a su alto polimorfismo, los sistemas antigénicos HLA y MICA y la alorespuesta humoral frente a ellos, en particular la existente en el receptor del órgano ya antes del trasplante, contribuyen de forma desfavorable en la evolución del injerto hepático, reduciendo la supervivencia post-trasplante e incrementando el riesgo de rechazo del aloinjerto.

Objetivos

En este trabajo, nos propusimos analizar la contribución de la compatibilidad antigénica y los anticuerpos preformados anti-HLA y anti-MICA en la evolución del injerto hepático de un grupo de 896 receptores consecutivos trasplantados en el Hospital 12 de Octubre entre marzo de 1986 y mayo de 2006.

Específicamente nuestros objetivos fueron los siguientes:

- 1) Realizar un estudio retrospectivo de la influencia de la compatibilidad antigénica HLA global entre el donante y el receptor sobre la supervivencia del aloinjerto hepático.
- 2) Valorar si la compatibilidad de los antígenos individuales del loci HLA tiene algún impacto sobre la supervivencia del aloinjerto hepático.
- 3) Analizar si los anticuerpos anti-HLA preformados (pre-trasplante) tienen un efecto nocivo sobre la supervivencia del injerto hepático a cinco años post trasplante.
- 4) Analizar si existe algún tipo de correlación entre la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA y el rechazo del injerto hepático.
- 5) Evaluar y comparar dos técnicas de detección de aloanticuerpos (citotoxicidad dependiente de complemento y citometría multiparamétrica con array de microesferas).
- 6) Analizar la diversidad alélica de MICA en una cohorte de donantes y receptores hepáticos, y su influencia sobre la supervivencia del injerto.
- 7) Investigar si los anticuerpos anti-MICA preformados juegan algún papel perjudicial en la evolución del trasplante hepático.
- 8) Estudiar si existe una relación entre los anticuerpos anti-MICA y el rechazo del injerto hepático.
- 9) Estudiar la expresión de MICA en el hígado en donación procedente de donantes vivos y donantes cadáver, y en el injerto retirado tras el fracaso del mismo a largo plazo.

Materiales y Métodos

1. Población estudiada

En este estudio retrospectivo, se analizaron un total de 896 trasplantes hepáticos consecutivos realizados en el Hospital Universitario Doce de Octubre entre marzo de 1986 y mayo de 2006. Del total de trasplantes estudiados, 782 fueron trasplantes primarios y 114 retrasplantes. La cohorte estaba compuesta por un 66% de varones y un 34% de mujeres en lista de espera para trasplante por enfermedad hepática irreversible. Un total de 115 trasplantes se realizaron en población pediátrica (pacientes menores de 15 años), y los restantes 781 trasplantes se realizaron en pacientes mayores de 15 años de edad.

1.1 Selección de receptores hepáticos

Se consideró receptor para trasplante de hígado a pacientes con diversas hepatopatías en estadio final (Tabla M1). El trasplante se llevó a cabo de acuerdo a varios criterios: 1) la compatibilidad ABO entre donante y receptor, 2) relación peso/tamaño entre donante y receptor, 3) tiempo transcurrido en la lista de espera y 4) la puntuación en la clasificación CTP (53). La puntuación MELD también se utilizó para la selección de algunos receptores pero no fue el único factor considerado.

Tabla M1. Hepatopatías en los pacientes trasplantados

Hepatopatías	Número de pacientes (%)
Hepatitis C	239 (26.7%)
Cirrosis alcohólica	144 (16.1%)
Cirrosis criptogénica	123 (13.7%)
Hepatocarcinoma	58 (6.5%)
Hepatitis B	54 (6 %)
Cirrosis biliar primaria	36 (4%)
Hepatitis fulminante	32 (3.6%)
Atresia biliar	31 (3.5%)
Metabolopatías congénitas	32 (3.6%)
Otras	26 (2.9%)
Colangitis esclerosante primaria	7 (0.8%)

1.2 Definición de pérdida del injerto hepático y diagnóstico de rechazo

La pérdida del injerto se definió como muerte del paciente o pérdida del hígado debido a: complicaciones vasculares o biliares derivadas de la cirugía, hemorragia gastrointestinal, cáncer, recurrencia de la enfermedad original, rechazo, fallo orgánico multisistémico, u otra causa no relacionada con el trasplante (159). Del total de pacientes que cumplían los criterios de inclusión (n=934), fueron excluidos del estudio (n=38) que fallecieron o perdieron el aloinjerto dentro de la primera semana post trasplante ya que las causas de la muerte probablemente están más relacionadas a complicaciones derivadas de la cirugía que a un componente inmunológico.

El diagnóstico de rechazo del injerto se recogió de las historias clínicas. Las biopsias hepáticas se realizaron, por indicación clínica, en aquellos pacientes con una persistente e inexplicada alteración de la función hepática. El grado y tipo de rechazo se cuantificó siguiendo los criterios establecidos por el grupo de Banff (127, 160, 161).

1.3 Inmunosupresión

El régimen de inmunosupresión de los pacientes trasplantados consistió de terapia doble con tacrolimus y prednisona, o terapia triple con ciclosporina A,

prednisona y azatioprina hasta 1997. Posteriormente, debido al riesgo de mielosupresión, se sustituyó la azatioprina por el micofenolato mofetil (MMF). El protocolo de tratamiento incluye tacrolimus (adultos: 0.10-0.20mg/kg/día, niños 0.30mg/kg/día) y prednisona (20mg/día con disminución gradual de la dosis hasta retirada del fármaco 3 a 6 meses post trasplante). En pacientes con riesgo de rechazo, previos episodios de rechazo o toxicidad renal se aplicó un protocolo consistente en: MMF (750-1000mg/12 horas) y prednisona mas/o menos tacrolimus (utilizado en dosis inferiores o suspendido en casos de toxicidad renal).

2. Obtención y conservación del material biológico

2.1 Suero

El suero pre-trasplante del receptor se separó de la sangre recogida en tubo seco sin anticoagulantes, mediante centrifugación a 2.500 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 min. Se utilizó dentro de las primeras 24 horas postrasplante para la realización de la prueba cruzada retrospectiva y se congeló a -80°C para su posterior utilización en la detección de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA por citometría multiparamétrica.

2.2 Obtención de linfocitos totales y separación de linfocitos T y B del donante

Los linfocitos totales del donante se obtuvieron a partir de muestras de ganglio o bazo conservadas en solución de Wisconsin. El ganglio o bazo se legó sobre una placa con medio celular (RPMI 1640 Gibco, España), y su filtrado se añadió sobre una columna de Ficoll-Paque (Lymphoprep) (Fresenius Kabi Norge AS, Oslo, Noruega)

procurando evitar que las dos fases se mezclasen. El aislamiento de los linfocitos totales se realizó mediante centrifugación durante 40 min a 1800 rpm. De la interfase resultante se extrajo una capa de leucocitos que fueron lavados dos veces con medio RPMI con 1% de una mezcla antibiótica de penicilina (10000 uds) y estreptomicina (10mg/mL) (Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) centrifugando 10 min a 1200 rpm.

La separación de linfocitos T y B se realizó a partir de los linfocitos totales previamente aislados por adherencia a una microcolumna en lana de nylon (Fenwell Lab., IL, EEUU).

Tras incubar la suspensión de linfocitos en la columna de lana, en un baño de agua a 37°C durante 30 min, se abre la microcolumna recogiendo el eluido y lavándolo con 10ml de solución RPMI y FCS 20%, lo que permite obtener una fracción celular enriquecida en linfocitos T. Se realiza un segundo lavado añadiendo el mismo medio, esta vez prensando el paquete de lana de nylon, de arriba abajo mientras pasa el medio; para con esta maniobra obtener la fracción celular enriquecida en linfocitos B.

Ambas fracciones celulares se lavaron una vez, centrifugando a 1200 rpm 10 min. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células con solución RPMI y FCS 20% a una concentración de 1×10^6 células/mL utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico para realizar el conteo celular. Los linfocitos T y B se utilizaron posteriormente para la tipificación de antígenos HLA del donante y la prueba cruzada.

2.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo a partir de sangre heparinizada en los receptores, y muestras de bazo en los donantes. Las muestras de bazo se conservaron en bidones con nitrógeno líquido hasta su utilización. El ADN se aisló con DNAzol (Molecular Research Centre Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y se ajustó a una concentración de 100 ng/ml. Se congeló a -80°C hasta su posterior utilización para el tipaje HLA del receptor y la tipificación de antígenos MICA de donante y receptor.

3. Determinación de antígenos HLA en el donante y el receptor

Los antígenos HLA se determinaron mediante técnicas serológicas o genéticas. En el donante, todo el tipaje se realizó por serología (técnica de microlinfocitotoxicidad estándar), mientras que en el receptor el tipaje de antígenos de clase I se realizó de forma serológica y el tipaje de clase II se hizo mediante técnicas genéticas (PCR-SSO).

3.1 Tipificación HLA por técnicas serológicas

3.1.1 Antígenos de clase I (HLA-A, B, C, Bw4/Bw6)

La determinación de los antígenos HLA-A, B, C, Bw4/Bw6 se llevó a cabo por microlinfocitotoxicidad estándar sobre linfocitos totales o T. Para generar las placas de tipaje se utilizó, hasta 1996, una batería de aloantisueros o anticuerpos monoclonales de especificidad conocida y validados por anteriores reuniones (Workshops) de histocompatibilidad nacionales e internacionales. Los sueros se añadieron (1µL por pocillo) utilizando una microjeringa Hamilton (Reino Unido) sobre placas de plástico para tipaje (60 pocillos; tipo Terasaki, Steriling, Reino Unido) recubiertas de parafina

líquida, y se conservaron a -80°C hasta su utilización. Los linfocitos totales o T previamente ajustados a 1×10^6 células/ml se añadieron a las placas de tipaje descongeladas ($1 \mu\text{L}$ por pocillo) utilizando una microjeringa Hamilton con dispensador múltiple y se incubaron durante 30 min a T^{a} ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$). Posteriormente se añadió $5 \mu\text{L}$ de complemento de conejo por pocillo (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, EEUU) y después de 1 hr de incubación las placas se leyeron bajo un microscopio invertido con contraste de fase. El tipaje HLA se determinó midiendo el grado de lisis celular en cada pocillo provocado por la activación del complemento por el aloantisero o anticuerpo monoclonal de especificidad conocida. La lisis celular se cuantificó de 2 a 8 midiendo el porcentaje de células muertas: entre el 0-20% (1), entre el 20-40% (2), entre el 40-60% (4), entre 60-80% (6) y más de 80% (8).

Desde 1996 en adelante se utilizaron placas de tipaje comerciales con anticuerpos monoclonales y complemento predispensados (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, EEUU). Los linfocitos T se incubaron en placa durante 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se fijaron con FluroQuenchTM (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, EEUU) un reactivo que contiene EDTA, que detiene la lisis celular, bromuro de etidio, que tiñe células muertas, y naranja de acridina, que tiñe células vivas y las placas se leyeron bajo un microscopio invertido de fluorescencia (Figura M1).

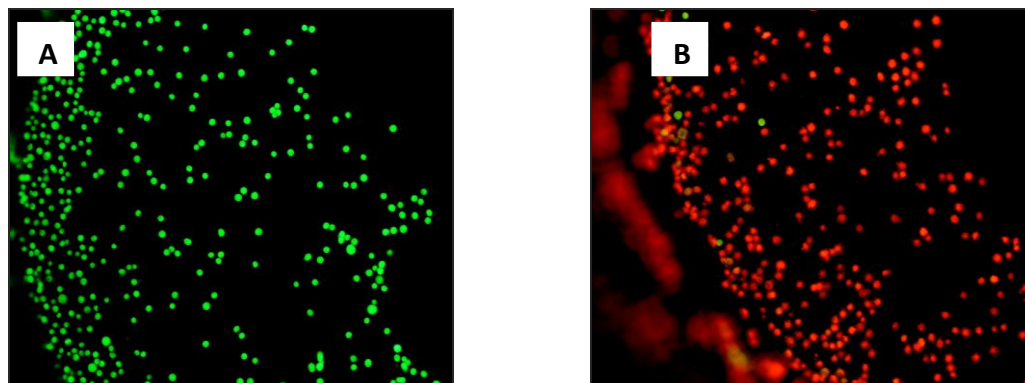


Figura M1. Microlinfocitotoxicidad estándar. Los linfocitos se incubaron con los fluorocromos bromuro de etidio y naranja de acridina para evaluar su viabilidad. A) La naranja acridina atraviesa la membrana celular de los linfocitos y tiñe los ácidos nucleicos, generando una fluorescencia de color verde. B) El bromuro de etidio no atraviesa las membranas intactas, se intercala con el ADN de células muertas y les da un color rojo naranja fluorescente.

3.1.2 Antígenos de clase II (HLA-DR, -DQ)

Tanto la preparación de las placas de tipaje, como la determinación de antígenos HLA-DR, -DQ se realizó de forma similar a las de los antígenos HLA-A, -B, -C, -Bw4/Bw6. Para la determinación de antígenos de clase II se utilizaron células B aisladas, lavadas y ajustadas como previamente se ha descrito. Se incubaron las células B añadidas a la placa durante 50 min a temperatura ambiente (20-25°C). Tras la incubación se añadieron 5µL de complemento de conejo por pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1hr y 40 min. La lectura de placas se realizó como previamente se ha descrito. A partir de 1996, se utilizó la misma técnica descrita anteriormente para tipaje de clase I así como placas comerciales de anticuerpos monoclonales.

3.2 Tipificación HLA clase II por técnicas genéticas, o de genética molecular.

Dado el alto grado de polimorfismo del sistema HLA, se utilizaron técnicas de biología molecular (PCR-SSO) con mayor sensibilidad para identificar genes HLA de clase II en el receptor.

La técnica PCR-SSO se basa en la amplificación de una zona polimórfica de ADN (reacción en cadena de la polimerasa, PCR), seguida de una hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) fijados en una membrana de nylon.

La tipificación de antígenos HLA-DRB1 y -DQB1 se realizó por PCR-SSO mediante un ensayo automatizado–utilizando los kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus y HLA-DQB1 Multiplex (Innogenetics, Gante, Bélgica). Este ensayo se utiliza para tipar a nivel molecular los alelos DRB1 (grupo de alelos DRB1*01 a DRB1*16) y los alelos DQB1 (grupo de alelos DQB1*02-DQB1*06).

La técnica de PCR-SSO (Figura M2) consistió de cuatro pasos:

I. Amplificación de los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1: Se extrajo ADN a partir de una muestra de sangre (5ml), y ajustó a [20 -150 ng/uL], empleando agua estéril o TE (Tris + EDTA). Luego se determinó el volumen de la mezcla de amplificación según la tabla M2.

El volumen final en cada pocillo fue de 50µL: 45µL de la mezcla + 5µL de ADN. El termociclador se preparó con las condiciones de amplificación de la tabla M3.

Tabla M2. Mezcla de amplificación para preparación de PCR-SSO

Locus	Nº muestras	Agua dest	Amplif. Buffer	Primer Solution (uL)	LiPATaq (uL)
DRB1	1	24	10	10	1
DQB1	1	24	10	10	1

Tabla M3. Condiciones de PCR-SSO:

Pasos	Temperatura y tiempo de incubación	Nº ciclos
Paso 1	95°C, 5min	1
Paso 2	95°C, 30seg	30
	58°C, 20seg	
	72°C, 30seg	
Paso 4	72°C, 10min	1
Paso 5	4°C, forever	1

II. Desnaturalización, hibridación y lavado astringente : Previo a su utilización (30-45min) se encendió el aparato (AutoLipa, Innogenetics, Bélgica) para calentar el baño de agua (en agitación) a una temperatura de 56°C y precalentar soluciones de hibridación y de lavado a una temperatura entre 37°C-56°C.

Utilizando pinzas, se retiró el número de tiras Inno-Lipa a utilizar (una por muestra más una muestra control de InnoLipa) y se identificaron con lápiz. Se pipeteó 10ul de la solución desnaturalizante en la esquina de cada cubeta/canal de tiras seguido de 10ul del ADN amplificado mezclando cuidadosamente y utilizando puntas esterilizadas y se dejó desnaturalizar a temperatura ambiente 20-25°C. Luego se añadió 2ml de solución de hibridación (previamente calentada) al ADN amplificado y desnaturalizado en cada canal/cubeta de tiras y se mezcló con cuidado. Se re-colocarón las tiras de InnoLipa en cada canal/cubeta asegurándose que la línea azul de la tira estaba mirando hacia arriba y completamente sumergida en la solución. Se colocó la bandeja en el baño de agua de

agitación a una temperatura de $56^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ permitiendo que las tiras y el líquido se mezclasen y se incubó 30min en agitación. Tras la hibridación, el aparato realizó un lavado astringente en el que un aspirador de vacío retiró el líquido de cada cubeta, y el aparato añadió 2mL de la solución de lavado en cada canal/cubeta. Las tiras en la bandeja se lavaron mediante el balanceo constante de la solución de lavado a una temperatura de 20 - 25°C. Por último, el aparato aspiró la solución y añadió 2 ml de solución de lavado astringente precalentada en el baño de agua de agitación a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 10 min en cada cubeta.

III.Revelado de color: Todas las incubaciones sucesivas se realizaron a 20 - 25°C en un agitador. Cada tira se lavó dos veces durante 1 min con 2 ml de la solución de lavado de trabajo. Se añadieron 2 ml de la solución de conjugado de trabajo a cada cubeta y se incubaron durante 30 min con la bandeja en agitación. Acto seguido se volvió a lavar cada tira dos veces durante 1 min con 2 ml de la solución de lavado de trabajo seguido de 2 ml de tampón sustrato. Luego se añadieron 2 ml de la solución de sustrato de trabajo diluida en cada cubeta y se incubaron 30 min con la bandeja en agitación. El revelado se detuvo lavando las tiras dos veces en 2 ml de agua destilada con la bandeja en agitación durante al menos 3 min. Finalmente se retiraron las tiras de las cubetas utilizando pinzas y se colocaron en papel absorbente hasta que estuvieron completamente secas.

IV.Interpretación del patrón de reactividad de las sondas: Antes de interpretar los resultados se comprobó 1) que el patrón de reactividad de la muestra control LiPA era correcto, asegurándose que la banda de control de conjugado de la tira estaba alineada con la banda de control de conjugado de la tarjeta de lectura de plástico 2) que las dos primeras bandas de control eran positivas, para poder validar cada tira individual. El

patrón de reactividad de las sondas se interpretó utilizando el Software Liras siguiendo las instrucciones del fabricante.

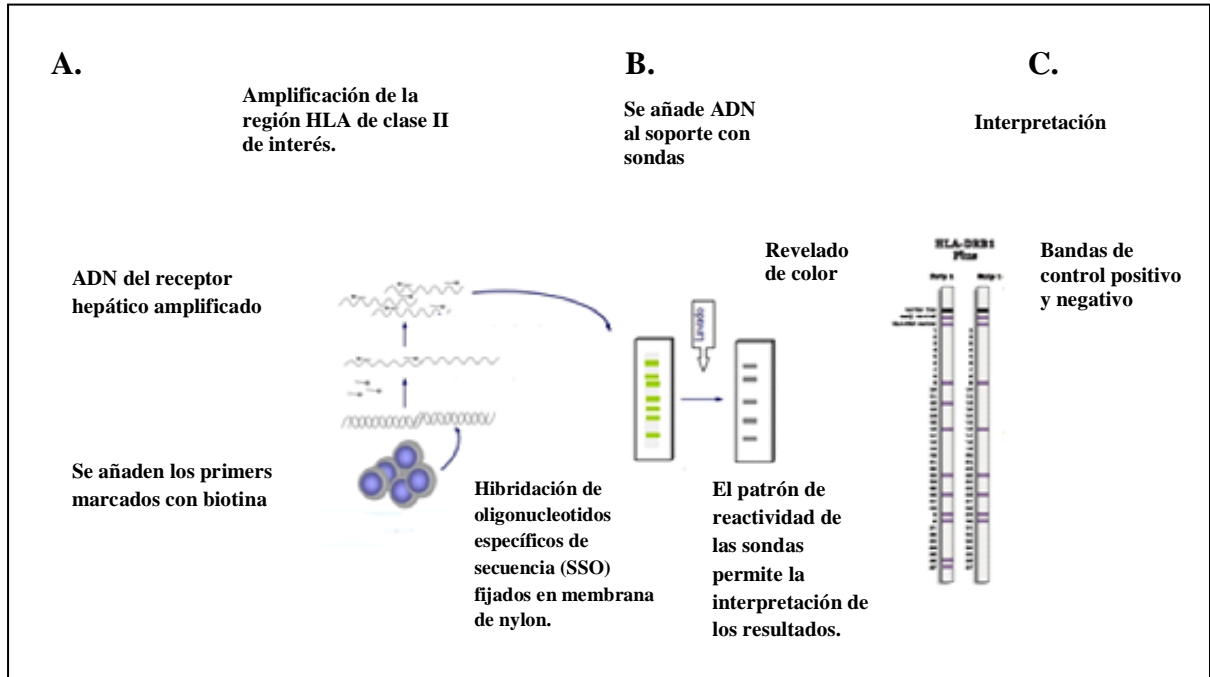


Figura M2. Tipaje HLA II mediante la técnica de PCR-SSO. A) Generación de millones de copias de ADN del receptor hepático para la posterior amplificación de la región de interés (HLA clase II). B) El ADN (amplificado) del receptor se incubó en membranas de nylon (tiras de Inno Lipa) que contienen 37 oligonucleótidos específicos de secuencia adheridos a la superficie. Tras una serie de incubaciones y lavados se incuban las tiras en una solución de sustrato que contiene cromógeno para su revelado. C) Interpretación del patrón de reactividad de las sondas y determinación del tipaje HLA II. (Adaptado de www.immunologiaenlinea.es coordinador J Peña Martínez y www.innogenetics.com).

4. Determinación de antígenos MICA

4.1 Población estudiada

Se estudió una cohorte de 33 parejas donante- receptor (66 individuos) para los cuales se disponía de información sobre los anticuerpos pre-formados anti-MICA.

4.2 Genotipaje de MICA por LABType® SSO

El genotipaje de MICA se realizó utilizando el ensayo LABType®SSO (One Lambda, Canoga Park, CA) que aplica tecnología Luminex a la tipificación inversa de ADN de SSO. Primero se realiza una PCR para amplificar la región de ADN de interés, y el producto se vuelve a hibridar y a desnaturalizar con sondas de ADN complementarias conjugadas con microbeads cifrados de forma fluorescente. La intensidad de la fluorescencia y los patrones de reacción emitidos por los microbeads al pasar por el analizador de flujo LABScan 100, permiten el genotipaje de la muestra. (Figura M3).

El protocolo resumido para el genotipaje de MICA por LABType SSO fue el siguiente:

I. Amplificación: Se ajustó el ADN a [20ng/μl] utilizando agua estéril, y se mezcló el volumen de D-mix y cebadores necesarios (Tabla M4). Acto seguido, se pipetearon 2 μl de ADN ajustado a cada pocillo de la placa de PCR y se añadieron 18 μl de la mezcla de amplificación (excepto la Taq polimerasa que se añadió al final) por la cada muestra para un volumen total de 20 μl/pocillo. La PCR se realizó según las condiciones de la tabla M5.

Tabla M4. Mezcla de amplificación para PCR para ensayo LABType® SSO

Nº de reacciones	D-mix (μl)	Cebador de amplificación (μl)	Taq polimerasa (μl)
1	13,8	4	0,2
10	138	40	2
50	690	200	10
96	1491	432	21,6

Tabla M5. Condiciones de PCR para el ensayo LABType® PCR-SSO

Pasos	Temperatura y tiempo de incubación	Nº ciclos
Paso 1	96°C, 3min	1
	96°C, 20seg	
Paso 2	60°C, 20seg	30
	72°C, 30seg	
Paso 3	72°C, 10min	1
Paso 4	4°C, forever	1

II. Desnaturalización: Tras la amplificación, se extrajo la placa de PCR del termociclador y se transfirieron 5 µl de cada pocillo a una nueva placa de PCR. Se añadieron 2,5 µl de tampón de desnaturalización + 5 µl de tampón de neutralización y se mezcló. Previo al tercer paso se mantuvo la placa de PCR en hielo.

III. Hibridación: El termociclador se programó a 60°C para calentar el bloque térmico previo a su uso y se preparó la mezcla de hibridación según la tabla M6. Se añadieron 38 µl de mezcla de hibridación a cada pocillo y se agitó la PCR en el vórtex a velocidad baja antes de colocarla en el termociclador a 60°C durante 15min. Tras la incubación se añadieron 100 µl de tampón de lavado a cada pocillo y se centrifugó la placa de PCR durante 5min a 1000-1300g. Esto se repitió hasta completar 3 lavados. Durante la tercera centrifugación se preparó la solución de SAPE 1X según la tabla M7.

Tabla M6. Preparación de la mezcla de hibridación.

Nº de pruebas	Tampón de desnaturalización µl	Tampón de neutralización µl	Tampón de hibridación µl	Tampón de lavado µl	Mezcla de microesferas µl
1	2,5	5	34	480	4
10	25	50	340	4800	40
20	50	100	680	9600	80
50	125	250	1700	2400	200
96	240	480	3264	46080	384

Tabla M7. Volúmenes de SAPE y tampón de SAPE

Nº de pruebas	SAPE de reserva µl	Tampón con SAPE µl
1	0,5	49,5
10	5	495
20	10	990
50	25	2475
96	48	4752

IV. Etiquetado: En el último paso se añadió 50 µl de solución SAPE 1X/pocillo, y se agitó la PCR en el vórtex a velocidad baja. Luego, se introdujo la placa de PCR en el termociclador precalentado a 60°C e incubó 15 min. Se añadieron 100 µl de tampón de lavado a cada pocillo y se centrifugó la placa de PCR 5min a 1000-1300g. El sobrenadante se decantó y se añadieron 70 µl de tampón de lavado a cada pocillo para con una pipeta multicanal transferir el contenido de la placa de PCR a una placa de lectura que se mantuvo a 4°C hasta su lectura en el analizador LABScan™ 100. La adquisición de muestras y datos con el LABScan™ 100 se realizó según las instrucciones del fabricante.

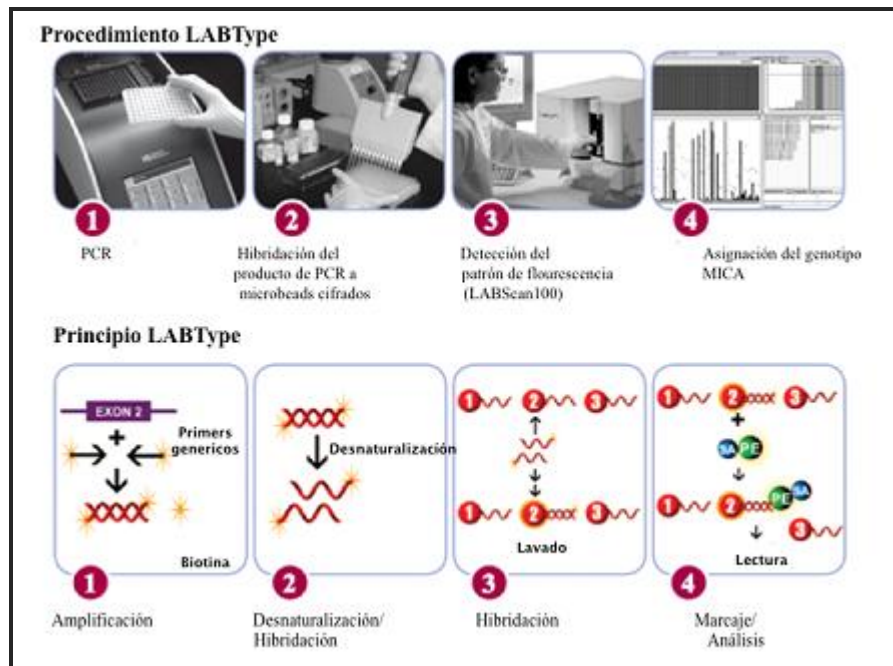


Figura M3. Genotipaje MICA por LABTypeSSO. El ensayo LABType utiliza la tipificación inversa de ADN de SSO utilizando sondas fijadas a la superficie de diferentes grupos de microbeads. El patrón de fluorescencia emitido por cada microbead permite determinar la especificidad de cada microesfera específica para MICA y la posterior asignación del genotipo. (Adaptado de www.onelambda.com).

4.3 Asignación del genotipo MICA

La asignación del genotipo MICA se realizó utilizando el software “LABType SSO software for Windows” siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se obtuvo más de una posible combinación de alelos MICA, se asignó el tipaje basándose en las frecuencias publicadas para población caucásica y mediterránea (145, 162).

5. Métodos de detección de anticuerpos

5.1 Prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)

Para evaluar la sensibilización del receptor frente al donante, previo a la realización del trasplante, se realizó una prueba cruzada que determina los anticuerpos

preformados en el receptor frente a linfocitos totales, o linfocitos T y B del donante utilizando la técnica estándar de citotoxicidad mediada por complemento (CDC). Se utilizaron placas de plástico (tipo Terasaki) que se cubrieron con parafina para evitar la evaporación de los sueros. Se añadió por triplicado 1 μ L de RPMI, control positivo y control negativo por placa así como 1 μ L de suero pre-trasplante (y cualquier otro suero histórico del paciente) por pocillo con una microjeringa Hamilton. Luego se añadió 1 μ l de la suspensión de linfocitos previamente extraídos y ajustados a una concentración de 1×10^6 células/ml y se incubó durante 30 min. Tras la incubación se añadió complemento de conejo. Tras una hora de incubación se leyó la prueba en un microscopio invertido con contraste de fases. El resultado de la prueba cruzada se evaluó como se ha descrito con anterioridad (apartado 3.1) (Figura M4).

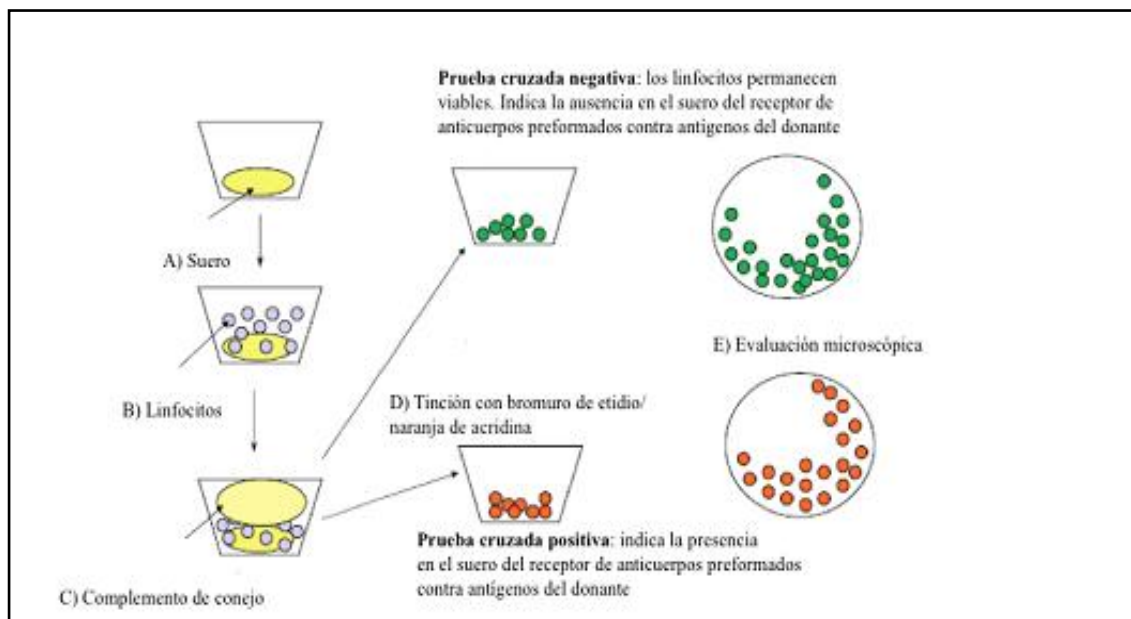


Figura M4. Citotoxicidad mediada por el complemento (prueba cruzada). A) Se añade suero del receptor hepático al pocillo de una placa de tipo Terasaki seguido de B) linfocitos del donante con un tipaje HLA conocido. Tras la incubación, que permite la unión de los anticuerpos con linfocitos, C) se añade complemento de conejo. Si existen anticuerpos preformados en el suero del receptor, éstos se unirán a los linfocitos del donante y el complemento se activará causando una lisis celular. La lisis celular se puede visualizar usando una D) tinción de bromuro de etidio que tiñe las células muertas rojo y naranja de acridina que tiñe las células vivas verde. E) El grado de lisis celular se puede evaluar microscópicamente. (Adaptado de Fuggle et al 2008 (163)).

5.2 Citometría multiparamétrica Luminex xMAP

La presencia de anticuerpos HLA y MICA se determinó utilizando la tecnología de Luminex xMAP (Luminex Corporation, Austin, Texas) basada en principios de la citometría de flujo (Figura M5).

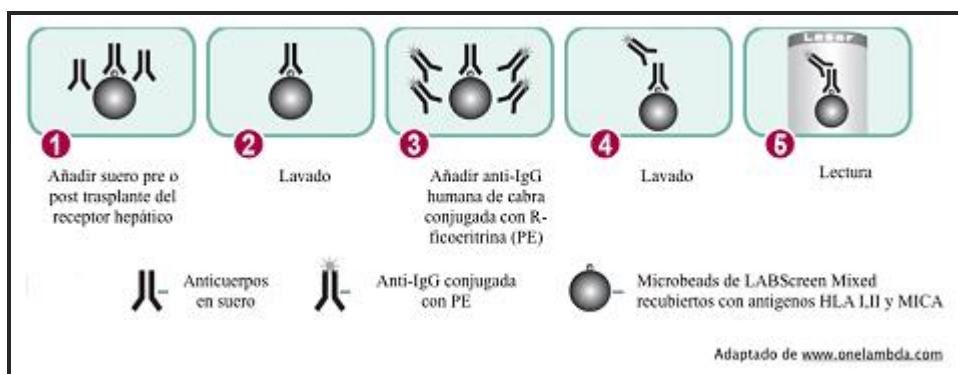


Figura M5. LABScreenMixed para la detección de anticuerpos preformados anti -HLA y MICA.

5.2.1 Análisis cuantitativo de anticuerpos HLA y MICA por LABScreen®Mixed

Para la detección de anticuerpos anti- HLA y MICA se utilizaron los productos LABScreen®Mixed siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve:

Se centrifugó un tubo seco de sangre (10mL) a 2500rpm x 5min para obtener suero, que se diluyó a la mitad con medio RPMI (30µl suero + 30µl RPMI). En una placa de 96 pocillos de fondo en V se añadieron 2.5µL de microbeads LABScreen® Mixed (One Lambda) recubiertos con antígenos purificados HLA y MICA por pocillo + 10µL de suero diluido para su incubación durante 30min a 20-25°C. Se colocó la placa (cubierta con tapa y protector de luz color negro) en el agitador a velocidad media. Se lavó la placa con 70µL de WB (Wash Buffer 10x) diluido a 1x con agua destilada y se centrifugó a 2500rpm x 5min. Se descartó el sobrenadante mediante un golpe seco de la placa, y se volvió a repetir el lavado 2 veces. Luego, se diluyó el conjugado IgG anti-

humano de cabra conjugado con R-ficoeritrina 1/100 y se añadió (100 µL/pocillo) a la placa que se volvió a cubrir para una incubación de 30min en el agitador. Se realizaron 2 lavados como previamente descrito y después del último lavado se añadió 70µL de WB dejando la placa (tapada) en el agitador en rotación 5min, para su posterior lectura en el citómetro Luminex.

Todos los sueros se estudiaron con equipos LABScreen®Mixed (One Lambda, Canoga Park, CA) que reconocen las siguientes especificidades antigénicas de HLA clase I, II y MICA:

Tabla M8. Especificidades antigénicas del kit LABScreen®Mixed

HLA/ MICA	Especificidad antigénica
HLA-A	A1,A2,A3,A11,A23,A24,A25,A26,A29,A30,A31,A32,A33,A34, A36,A43,A66,A68,A69,A74,A80
HLA-B	B7,B8,B13,B18,B27,B35,B37,B38,B39,B41,B42,B44,B45,B46,B47,B48,B49,B50,B52,B52 ,B53,B54,B55,B56,B57,B58,B59,B60,B61B62,B63,B64,B65,B67,B71,B72,B73,B75,B76,B 77,B78,B81,B82
HLA-Bw	Bw4, Bw6
HLA-Cw	Cw1,Cw2,Cw4,Cw5,Cw6,Cw7,Cw8,Cw9,Cw10,Cw12,Cw14,Cw15,Cw16,Cw17,Cw18
HLA-DR	DR1,DR103,DR4,DR7,DR8,DR9,DR10,DR11,DR12,DR13,DR14, DR15,DR16,DR17,DR18,DR51,DR52,DR53
HLA-DQ	DQ2,DQ4,DQ5,DQ6,DQ7,DQ8,DQ9
HLA-DP	DP1,DP2,DP3,DP4,DP5,DP9,DP11,DP13,DP14,DP18,DP40
MICA	MICA001,MICA002,MICA004,MICA007,MICA009,MICA012, MICA017, MICA018,MICA019,MICA027

5.2.2 Análisis cualitativo de anticuerpos anti-MICA donante específicos por el ensayo LABScreen® Single Antigen

Para determinar si los pacientes con anticuerpos pre-formados anti-MICA tenían además anticuerpos anti-MICA donante-específicos, se realizó un segundo ensayo más sensitivo por Luminex, denominado LABScreen®Single Antigen (LSA) que determina

los anticuerpos frente a antígenos específicos de MICA en el suero del receptor. Esta técnica, también se utiliza en el estudio de anticuerpos anti-HLA donante-específicos y tiene utilidad para determinar las especificidades antigénicas de anticuerpos preformados en pacientes hiperimmunizados de alto riesgo.

A continuación se resume el protocolo para la técnica: Se diluyó la muestra de suero: 6 µl de suero + 6 µl de RPMI en un tubo eppendorf. En una placa de 96 pocillos de fondo en V se añadió 2 µl de microesferas por pocillo y agregó 10 µl de la muestra diluida. Se colocó la placa (cubierta con su tapa y protector de luz color negro) en el agitador a una velocidad media durante 30 min. Finalizada esta incubación se centrifugó a 2500 rpm x 5 min, y se descartó el sobrenadante mediante un golpe seco de la placa. Se lavó 2 veces más añadiendo 100 µl de WB y centrifugando como previamente descrito. Acto seguido se preparó el conjugado (100 µl de WB por 1 µl de conjugado) y se añadió 100 µl por pocillo. Se incubó la placa (cubierta como en pasos previos) 30 min en el agitador y después se centrifugó a 2500 rpm x 5 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante mediante golpe seco y se realizaron 2 lavados más (tal como se describió anteriormente). Después del último lavado se añadió 70 µl de Líquido de Sistema y se dejó la placa (tapada) en el agitador en rotación 5min y se realizó la lectura en el Citómetro Luminex.

5.2.3 Descripción del funcionamiento del aparato y análisis de los resultados

Las microesferas en suspensión pasan por el analizador de flujo LABScan™ que detecta la emisión fluorescente de R-ficoeritrina de cada microesfera mediante dos laser; un primer laser rojo de 635nm que identifica el tipo de microesfera, y un segundo laser verde de 532nm que determina la cantidad de antígeno/anticuerpo adherido a la microesfera. (Figura M6).

Posteriormente, el sistema de detección analiza la reactividad del suero basándose en la señal fluorescente que emite cada microbead después de corregir la unión no específica a la microesfera del control negativo. En el ensayo de LABScreen® Mixed, la señal normalizada fluorescente es igual al valor del microbead recubierto con antígeno HLA o MICA menos el valor del control negativo. Los cálculos se realizan utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Relación NBG} = \frac{S\#N - \text{Bola SNC}}{BG\#N - \text{Bola BGNC}}$$

Relación NBG Relación normalizada de fondo utilizada para asignar la fuerza de cada reacción anti-HLA

S#N Valor de la fluorescencia específico de la muestra para la microesfera N°

Bola SNC Valor de la fluorescencia específico de la muestra para la microesfera del control negativo

BG#N Valor de la fluorescencia del suero de control negativo de fondo para la microesfera N°

Bola BGNC Valor de la fluorescencia del suero de control negativo de fondo para la microesfera del control negativo

Suero NC Suero de control negativo (N° de catálogo OLI LS-NC) validado para un lote determinado de microesferas LABScreen®

Los valores de corte para anticuerpos pre-formados HLA se establecieron según recomendaciones del fabricante basándose en resultados estándar de nuestro laboratorio habiendo confirmado que los resultados de 300 sueros bien caracterizados por técnicas alternativas (LAT™ Mixed trays, One Lambda) se correlacionaba bien con los resultados obtenidos por el ensayo de LABScreen® Mixed

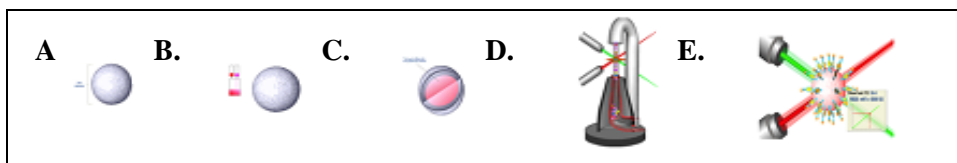


Figura M6. Tecnología xMAP: la tecnología xMAP utiliza A) microesferas de poliestireno carboxilado recubiertas con un reactivo de captura de objetivo B) el interior de cada microesfera consiste de una combinación específica de diferentes intensidades de fluoróforos rojos e infrarrojos que le dan a cada microesfera una radiación espectral única que permite su identificación C y D) Las microesferas en suspensión pasan por el analizador de flujo LABScanTM que detecta la emisión fluorescente de R-ficoeritrina de cada microesfera mediante E) un laser rojo que identifica el tipo de microesfera, y un laser verde que determina la cantidad de antígeno/anticuerpo adherido a la microesfera. (Adaptado de Luminexcorp.com).

Los valores de corte de fluorescencia utilizados en este trabajo para los anticuerpos pre-formados anti-MICA corresponden a la columna 2 (MFI bruto/Raw). Previamente se expresaban como se describe en la columna 1, y en la actualidad como se expresa en la columna 3 (Tabla M9):

Tabla M9. Clasificación de positividad de anticuerpos anti-MICA

Clasificación suero MICA	1) MFI expresada como proporción (ratio)	2) MFI bruto (Raw values)	3) MFI estandarizada (SFI)
Positivo	>5	>550	>350.000 (positivo alto)
Positivo dudoso	----	549-250	150.000-350.000 (positivo intermedio)
Negativo	<5	<250	15.000-150.000 (negativo)

Los sueros que dieron positivos en el rango MFI bruto/raw (positivo dudoso): 549-250 se repitieron hasta tres veces para intentar determinar si eran realmente positivos o no. Los que siguieron en esa zona gris (n=27), se eliminaron del estudio.

Finalmente, en los ensayos de Luminex Single Antigen (LSA) los puntos de corte se determinaron según la intensidad de fluorescencia media estandarizada (SFI) y fueron los siguientes:

Tabla M10. Clasificación de positividad de ensayo Luminex single antigen (LSA):

Grupo	SFI (intensidad de fluorescencia media)
Positivo fuerte	>350.000
Positivo intermedio	150.000-350.000
Positivo Débil	15.000-150.000
Negativo	<15.000

6. Estudio de expresión tisular en el hígado de antígenos MICA

6.1 Población estudiada

La expresión de antígenos MICA se estudió en los siguientes grupos:

A) Cuatro cuñas hepáticas procedentes de donante cadáver y obtenidas en el momento del trasplante (tiempo cero).

B) En dos de los receptores de hígado procedente de donante cadáver (grupo A, que perdieron el injerto) además de evaluar la expresión de MICA a tiempo cero, también se evaluó en la hepatectomía. Para estos pacientes también se dispuso de información sobre la presencia de anticuerpos anti-MICA en suero pre-trasplante y post-trasplante.

C) Dos biopsias hepáticas de donante vivo (tiempo cero)

Como control positivo de la expresión de antígenos MICA se utilizó una muestra de carcinoma de colon (153).

6.2 Inmunohistoquímica de MICA

Las cuñas hepáticas se obtuvieron en quirófano durante la cirugía de banco, o en el periodo post-reperfusión inmediato (tiempo cero) y las muestras de hepatectomía al retirar el injerto (164). El tejido se fijó por inmersión en formol tamponado al 10% durante 12-24hrs a 4°C. Con el fin de eliminar el agua de los tejidos de forma gradual, las muestras se sumergieron en alcohol etílico de concentraciones crecientes de 70%, 80%, 95% y 100% durante 3-4 hrs. Acto seguido, los tejidos se aclararon incluyéndolos en una sustancia miscible en parafina (ej: Xilol) entre 1-6 hrs para luego incluirlos en parafina fundida. El tejido se depositó en parafina líquida a 60° sobre un cassette y se dejó enfriar hasta formar un bloque de parafina solido. Se realizaron cortes de 5 micras al bloque de parafina con un micrótopo y se montaron las muestras sobre portaobjetos para su tinción con los anticuerpos (165, 166). De ahora en adelante siempre que se refiera a la “muestra” estaremos hablando de la muestra histológica montada sobre el portaobjetos.

Previo a la tinción, se desparafinó la muestra utilizando el proceso inverso al descrito anteriormente. Se utilizó xileno para eliminar restos de parafina, seguido de una re-hidratación progresiva del tejido utilizando concentraciones decrecientes de alcohol. Puesto que la fijación con formalina puede producir puentes metilo cruzados entre proteínas, y compuestos cálcicos que afectan zonas antigénicas, se realizó una recuperación del antígeno o técnica de “desenmascaramiento” para eliminar estos enlaces y restaurar la conformación de los epitopos en el tejido. La recuperación del antígeno MICA se consiguió tratando la muestra con 1mmol/L EDTA (pH 8) a 95°C x 30 min en el autoclave según el protocolo recomendado por el fabricante del anticuerpo.

La tinción de las muestras se realizó utilizando el sistema de visualización Universal LSAB™+ kit HRP. Rabbit/Mouse/Goat (DAB+) (Dako Diagnósticos S.A) basado en el método LSAB (Labeled Streptavidin Biotin Method- Figura M7). La detección del antígeno diana se realizó mediante la utilización de reactivos marcados con estreptavidina-biotina. Primero se bloqueó la peroxidasa incubando la muestra 5 min en una solución de peróxido de hidrógeno 3% y se aclaró con agua destilada. Acto seguido, se añadió 2.5µg/µL del anticuerpo policlonal primario de cabra anti-humano MICA (R&D) y se incubó 24hrs a 4°C (167). Tras la incubación y un lavado con agua destilada, la muestra se incubó con anticuerpo secundario biotinilado 15 min. Se repitió el lavado, se cubrió la muestra con estreptavidina y se incubó 15 min. Finalmente, se añadió una solución sustrato-cromógeno para visualizar el antígeno al microscopio. (Figura M7).

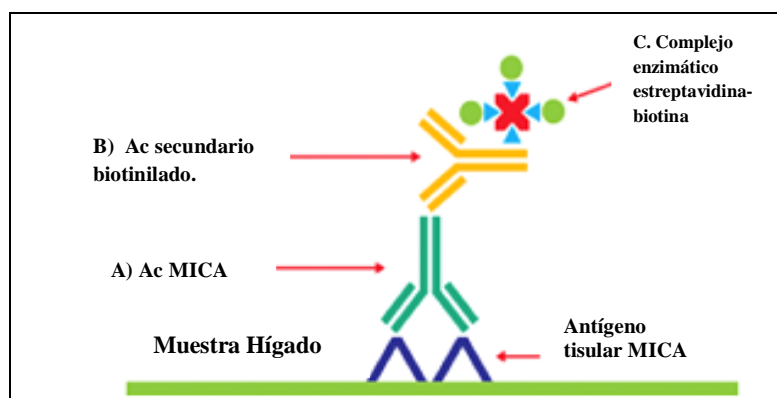


Figura M7. Método Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (LSAB). A) El anticuerpo (ac) anti-MICA se añade al tejido, tras reconocer antígenos (ag) MICA forma un complejo antígeno-anticuerpo B) Se añade un 2º ac biotinilado que reconoce como ag al ac anti-MICA (el ac 1º). C) Se añade un complejo enzimático estreptavidina-biotina-peroxidasa (conjugado) que reconoce moléculas biotiniladas como moléculas afines. Finalmente se añade un sustrato cromógeno que permite visualizar la reacción al teñir las zonas de interés de color marrón. (Adaptado de www.dako.com).

La tinción se evaluó con el asesoramiento de un patólogo senior. La positividad MICA de los tejidos se valoró según estos criterios:

Tabla M11. Valoración de la tinción MICA

Negativo	La muestra es completamente negativa o menos del 50% de la muestra presenta intensidad de tinción menor que el control.
Positivo Débil	Más del 50% de la muestra presenta menor intensidad de tinción que el control.
Positivo	Más del 50% de la muestra presenta igual o mayor intensidad de tinción que el control.

7. Análisis estadístico

La comparación entre grupos se efectuó utilizando las pruebas no paramétricas de supervivencia actuarial, supervivencia acumulativa (Kaplan-Meier) y “log rank” (logaritmo de rango). La supervivencia actuarial, o método de tabla de vida, se estimó a 1, 3 y 5 años. Esta prueba estadística calcula la supervivencia dividiendo el tiempo del estudio en intervalos y calculando la supervivencia en cada intervalo. La prueba de Kaplan-Meier, por el contrario, da proporciones exactas de supervivencia en un momento determinado en el tiempo. Para comparar las curvas de supervivencia entre dos o más grupos se utilizó el test de log rank que compara el número de eventos en cada grupo (muertes, fracasos del injerto etc- denominado valor observado (O)) con el número de eventos que podría esperarse de las pérdidas en ambos grupos (valor esperado (E)). Esto se compara mediante el cálculo de la suma $(O-E)^2 / E$ llamado X^2 y se compara el resultado con una distribución X^2 con $k-1$ grados de libertad (168, 169).

La relación entre variables dicotómicas se estudió con tablas de contingencia 2 x 2. El test t de Student se utilizó para comparar variables cuantitativas pareadas (ejemplo: frecuencia de alelos MICA entre donante y receptor).

Todos los p-valores en los test estadísticos utilizados fueron de dos colas. Un valor de $p < 0,05$ (*) fue considerado estadísticamente significativo y $p < 0,01$ (**) muy significativo.

El análisis estadístico con la información demográfica, datos clínicos e inmunológicos de cada paciente se realizó utilizando el paquete (SPSS) 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Resultados

1. Influencia de la compatibilidad HLA global en la supervivencia del aloinjerto

Del total de 896 trasplantes estudiados, se dispuso del tipaje completo donante-receptor HLA-A, HLA-B y HLA-DR en 853 trasplantes. Para investigar la influencia de la compatibilidad HLA en la supervivencia del aloinjerto, los trasplantes se clasificaron en: a) 2 grupos, de 0-3 incompatibilidades (“mismatches”, MM) y 4-6 MM, b) 3 grupos (0-4 MM, 5 MM ó 6 MM), c) y finalmente, 4 grupos (0-3 MM, 4 MM, 5 MM ó 6 MM).

Al comparar las parejas donante-receptor con 0-3MM frente a las de 4-6 MM, se observó tanto en la cohorte global (n=853), como en el análisis separado en población adulta (n=741) ó pediátrica (n=112) (Figura R1, Tabla R1) que las parejas con menor número de incompatibilidades (mismatches) tenían tasas de supervivencia ligeramente superiores a las de las parejas con mayor número de incompatibilidades, aunque esta diferencia no alcanzaba la significación estadística.

Tampoco se observaron diferencias en la supervivencia de los injertos cuando la población entera se clasificó en 3 y 4 grupos para su análisis (Tabla R2).

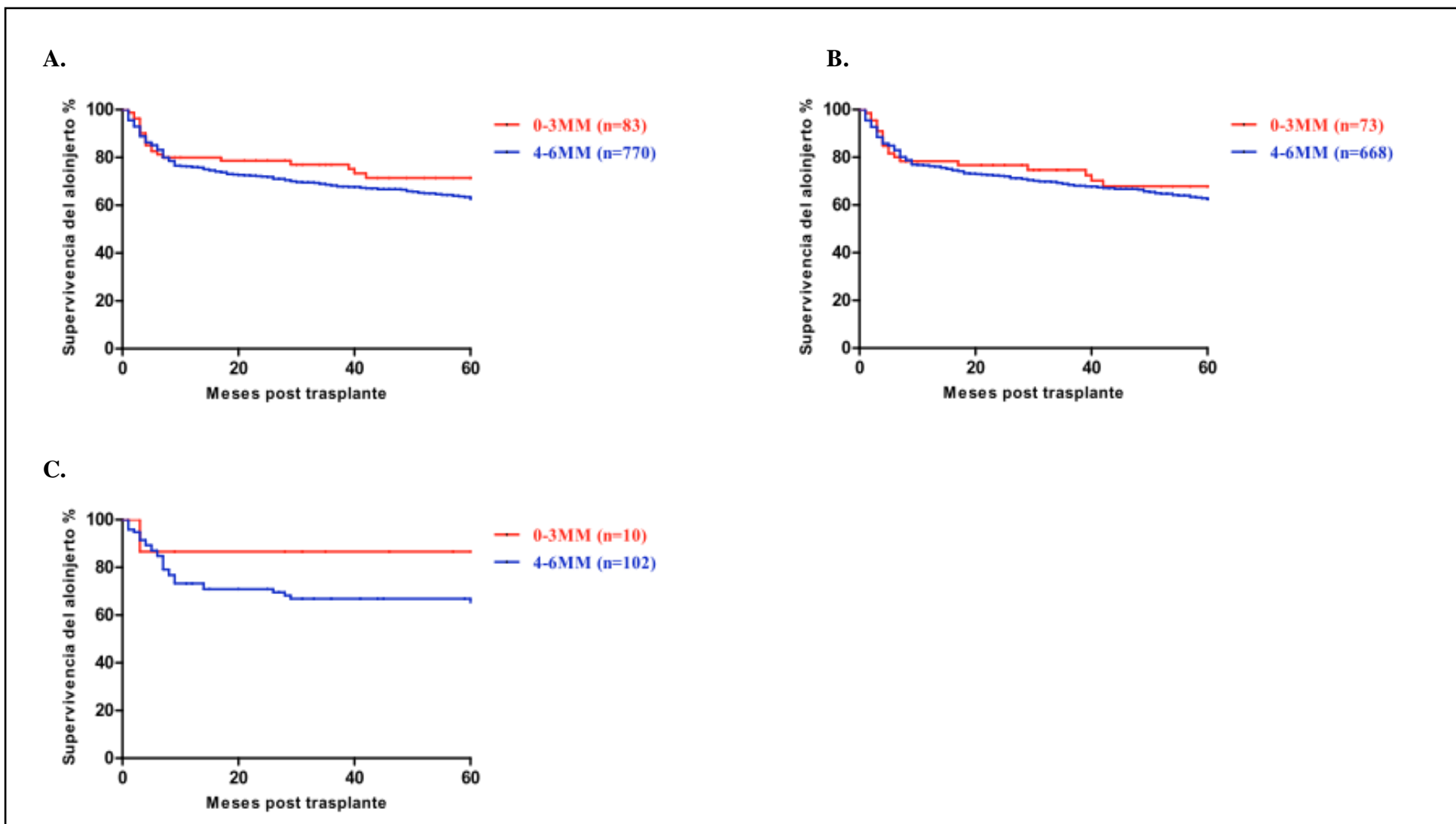


Figura R1. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos basado en el número de incompatibilidades/mismatches (MM) entre donante y receptor: A) Cohorte global (n=853), B) Adultos (n=741) y C) Pediátricos (n=112).

Tabla R1. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en el número de mismatches (MM).

Población	Mismatches (MM)	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
A) Global (n=853)	0-3MM (n=83)	68 (82.5%)	0.26(NS)	66 (81.5%)	0.45(NS)	63 (79%)	0.68(NS)
	4-6MM (n=770)	598 (76.5%)		539 (67.5%)		441 (66%)	
B)Adultos (n=741)	0-3MM (n=73)	60 (82%)	0.66(NS)	58 (80%)	0.70(NS)	55 (75%)	0.73(NS)
	4-6MM (n=668)	521 (78%)		474 (71%)		441 (66 %)	
C) Pediátricos (n=112)	0-3MM (n=10)	8 (80%)	0.28(NS)	8 (80 %)	0.15(NS)	8 (80%)	0.15(NS)
	4-6MM (n=102)	77(75%)		65(64%)		65(64%)	

NS: no significativo

Tabla R2. Impacto de la compatibilidad HLA en la supervivencia del injerto hepático basado en mismatches (MM) por tres o cuatro grupos.

Mismatches (MM)	1 año		3 años		5 años	
	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
0-4MM (n=290)	224 (77.2%)		213 (73.1%)		190 (65.5%)	
5MM (n=324)	258 (79.6%)	0.79(NS)	238 (73.5%)	0.75(NS)	227 (70.6 %)	0.34(NS)
6MM (n=239)	188 (78.6%)		167 (69.8%)		154 (64%)	
0-3MM (n=83)	68 (81.9%)		66 (79.5%)		62 (74.7%)	
4MM (n=207)	156 (75.3%)	0.59(NS)	146 (70.5%)	0.40(NS)	128 (61.8%)	0.11(NS)
5MM (n=324)	257 (79.5%)		237 (73.4%)		226 (69.9%)	
6MM (n=239)	189 (78.8%)		168 (70%)		155 (64.6%)	

NS: no significativo.

Puesto que la cohorte de receptores hepáticos incluía pacientes con distintas patologías causantes del fracaso hepático (Tabla M1), también se analizó el impacto de la compatibilidad HLA en la supervivencia del injerto en base a las diferentes hepatopatías originales. En este caso, solamente se analizaron las poblaciones de 0-3 MM y 4-6 MM para no reducir en exceso el tamaño de las muestras. Las diferencias en la supervivencia del injerto entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas en ninguna de las patologías (Tabla R3).

Finalmente, el efecto de la compatibilidad HLA-A, HLA-B y -DR se analizó por separado en pacientes retrasplantados (n=95) (incluyendo adultos y pediátricos). Contrariamente a lo observado hasta este momento, en retrasplantados la supervivencia actuarial fue un 15% mayor en aloinjertos con alta discrepancia antigénica (4-6MM) entre donante y receptor frente a las parejas con menos incompatibilidades (0-3MM) (Figura R2 y Tabla R4). Esta diferencia no alcanzó significación estadística.

Cuando se repitió este análisis de forma separada en trasplantes adultos y pediátricos, en la población adulta (n=68) se observó una tendencia similar, aunque no llegó a ser significativa a nivel estadístico (Figura R2 y Tabla R4). Sin embargo, en la población trasplantada pediátrica (n=27), los únicos 3 pacientes incluidos en el grupo 0-3 MM fallecieron en los 5 primeros años, dando lugar a diferencias de supervivencia entre este grupo (0%) y el grupo de 4-6 MM (83%) estadísticamente significativas (Figura R2 y Tabla R4).

Tabla R3. Impacto de la compatibilidad HLA (0-3MM versus 4-6MM) en la supervivencia del injerto en base a la hepatopatía original.

Patología	Mismatches (MM)	1 año	Valor p	3 años	Valor p	5 años	Valor p
		Supervivencia		Supervivencia		Supervivencia	
Enfermedades Metabólicas y Congénitas (n=32)	0-3MM (n=4)	4 (100%)	0.6(NS)	4 (100%)	0.51(NS)	4 (100%)	0.51(NS)
	4-6MM (n=28)	25 (89 %)		24 (86 %)		24 (86 %)	
Hepatitis C (n=239)	0-3MM (n=24)	20 (83%)	0.87(NS)	20 (83%)	0.52(NS)	17 (70.8%)	0.95(NS)
	4-6MM (n=215)	181 (84 %)		164 (76.3%)		151 (70.5%)	
Hepatitis B (n=54)	0-3MM (n=8)	6 (75%)	0.96(NS)	6 (75%)	0.96(NS)	6 (75%)	0.96(NS)
	4-6MM (n=46)	35 (76%)		35 (76%)		35(76%)	
Tumores (n=58)	0-3MM (n=7)	5 (71 %)	0.94(NS)	4 (57%)	0.62(NS)	3 (43 %)	0.56(NS)
	4-6MM (n=51)	37 (72.5%)		34 (66.7%)		32 (62.7 %)	
Cirrosis Alcohólica (n=144)	0-3MM (n=10)	10 (100%)	0.18(NS)	10 (100%)	0.11(NS)	9 (90 %)	0.22(NS)
	4-6MM (n=134)	114 (85%)		106 (79.1%)		100 (74.6%)	
Cirrosis Criptogénica (n=123)	0-3MM (n=11)	9 (82%)	0.43(NS)	7 (64%)	0.73(NS)	6 (54.5%)	0.65(NS)
	4-6MM (n=112)	83 (74.1%)		78 (69.6%)		75 (66.9%)	
Hepatitis Fulminante (n=32)	0-3MM (n=2)	1 (50%)	0.77(NS)	1 (50%)	0.98(NS)	1 (50%)	0.98(NS)
	4-6MM (n=30)	18 (60%)		14 (46.6%)		14 (46.6%)	
Atresia Biliar (n=31)	0-3MM (n=7)	7 (100%)	0.45(NS)	7 (100%)	0.35(NS)	7 (100%)	0.13(NS)
	4-6MM (n=24)	22 (91.6%)		21 (87.5%)		17 (70.8%)	
Otros (n=43)	0-3MM (n=2)	2 (66%)	0.71(NS)	2 (66 %)	0.83(NS)	2 (66%)	0.95(NS)
	4-6MM (n=41)	34 (82.9%)		31 (75.6 %)		28 (68.3 %)	

NS: no significativo. El grupo "Otros" (n=43) está constituido por las patologías Cirrosis Biliar Primaria (n=36) y Colangitis Esclerosante Primaria (n=7).

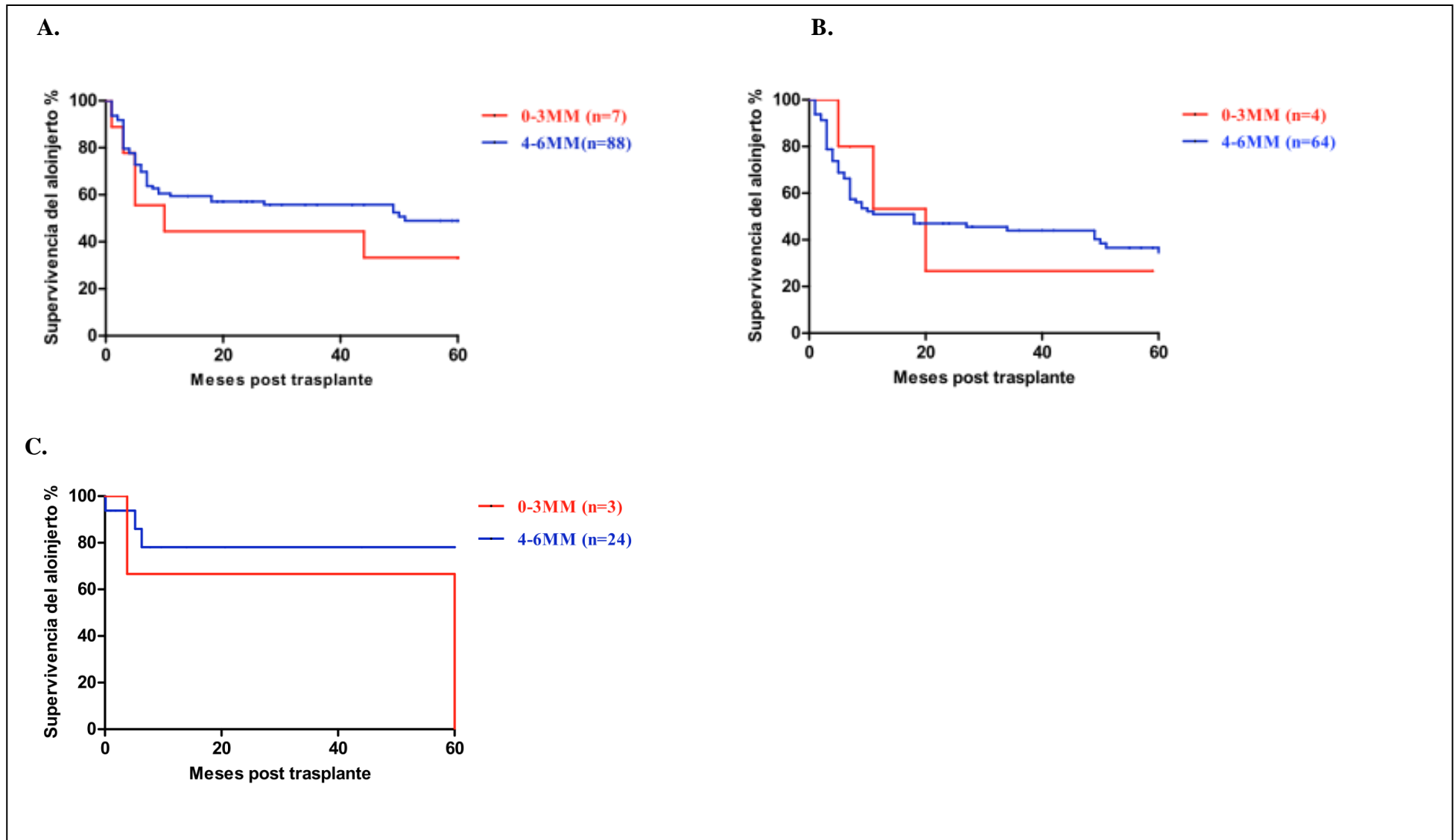


Figura R2. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos re-trasplantados basado en los mismatches (0-3MM versus 4-6MM) entre donante y receptor: A) Cohorte global (n=95), B) Adultos (n=68) y C) Pediátricos (n=27).

Tabla R4. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos re-trasplantados basado en el número de mismatches HLA (0-3MM versus 4-6MM) entre donante y receptor.

Población de Re-trasplantes	Mismatches (MM)	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
A) Global (n=95)	0-3MM (n=7)	5 (65 %)	0.38(NS)	4 (50 %)	0.59(NS)	3 (42 %)	0.7(NS)
	4-6MM (n=88)	50 (57 %)		50 (57 %)		50 (57 %)	
B) Adultos (n=68)	0-3MM (n=4)	3 (75 %)	0.41(NS)	1 (25 %)	0.89(NS)	1 (25 %)	0.91(NS)
	4-6MM (n=64)	37 (58 %)		28 (43.7 %)		25 (39 %)	
C) Pediátricos (n=27)	0-3MM (n=3)	2 (65 %)	0.79(NS)	2 (65 %)	0.67(NS)	0 (0 %)	<0.0001 (*)
	4-6MM (n=24)	23(95.8%)		20(83%)		20(83%)	

NS: no significativo.

2. Influencia de la compatibilidad de los antígenos individuales del loci HLA en la supervivencia del aloinjerto

En relación a los loci individuales, se dispuso del tipaje HLA-A de las parejas donante-receptor en 885 aloinjertos, tipaje HLA-B en 882 y tipaje HLA-DR en 854. Los receptores se estratificaron en 3 grupos de acuerdo al número de incompatibilidades o “mismatches”: 0MM, 1MM o 2MM, por cada locus de HLA. Cuando se analizó la influencia de la incompatibilidad antigénica en la supervivencia del injerto para cada locus individual (HLA-A, HLA-B o HLA-DR) se observó prácticamente la misma supervivencia actuarial a 1, 3 y 5 años, independientemente del número de “mismatches” (Tabla R5).

Este mismo análisis se repitió por hepatopatía individual (Tabla R6-R8). En los pacientes que se sometieron a un re-trasplante o que se trasplantaron por una hepatitis B se observaron diferencias en la supervivencia de acuerdo al número de mismatches en el locus HLA-A que fueron estadísticamente significativas al año, 3 años y 5 años. La supervivencia a los 5 años en aloinjertos con 2MM en el locus HLA-A fue superior que en aloinjertos con 1MM ó 0MM ($p=0.011$ en re-trasplantados y $p=0.02$ en pacientes con hepatitis B) (Figura R3, Tabla R6).

La compatibilidad en el locus HLA-B y HLA-DR no parece jugar un rol en la supervivencia del aloinjerto dentro de los otros subgrupos diagnósticos (Tablas R7 y R8).

Tabla R5. Impacto de los antígenos del loci HLA en la supervivencia del injerto hepático.

1 año		3 años		5 años		
HLA-A (n=885)	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
0MM (n=28)	21 (75%)	0.98(NS)	20 (71.4%)	0.87(NS)	19 (67.8%)	0.83(NS)
1MM (n=339)	250 (74%)		238 (70.2%)		224 (66.3%)	
2MM (n=518)	395 (76%)		361 (69.7%)		346 (66.8%)	
HLA-B (n=882)						
0MM (n=11)	7 (64%)	0.62(NS)	6 (55%)	0.46(NS)	6 (55%)	0.31(NS)
1MM (n=248)	193 (78%)		180 (73%)		174 (70%)	
2MM (n=623)	465 (75%)		432 (69%)		408 (65%)	
HLA-DR (n=854)						
0MM (n=18)	13 (72%)	0.55(NS)	10 (56%)	0.37(NS)	10 (56%)	0.29(NS)
1MM (n=330)	250 (76%)		240 (73%)		227 (69%)	
2MM (n=506)	389 (77%)		356 (70%)		339 (67%)	

NS: no significativo.

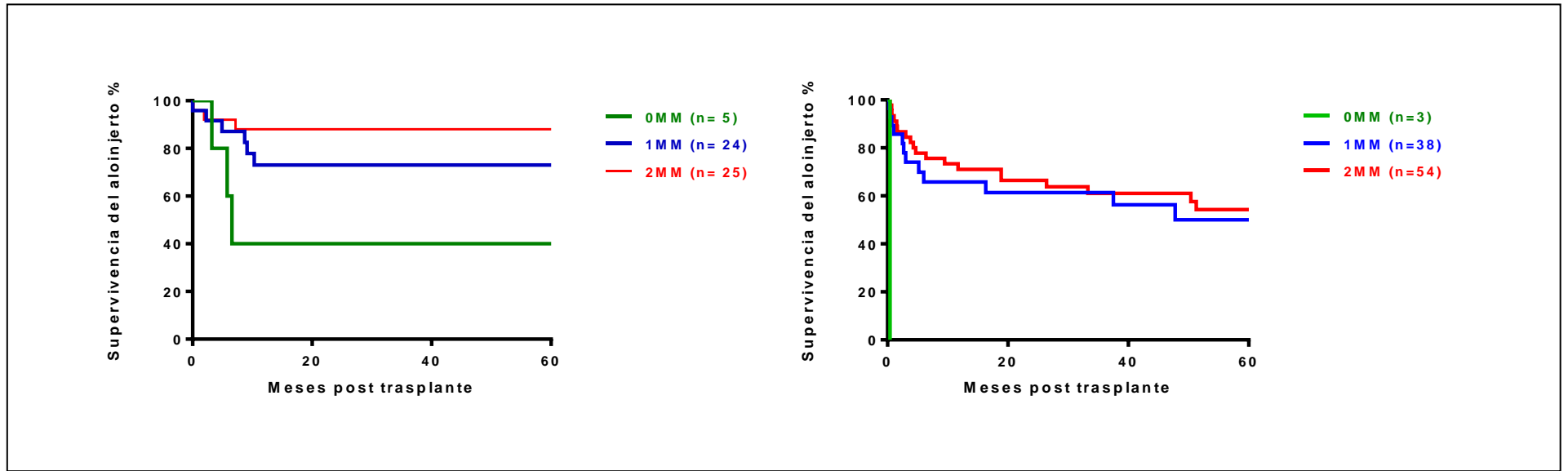


Figura R3. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos A) con Hepatitis B (n=54) y B) Re-trasplantados (incluyendo adultos y pediátricos; n=95) basado en el número de incompatibilidades en el locus HLA-A.

Tabla R6. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en número de mismatches (MM) en el locus HLA-A.

Patología	Mismatches (MM)	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor P	Supervivencia	Valor P	Supervivencia	Valor P
Enfermedades Metabólicas y Congénitas (n=32)	0MM (n=1)	1 (100%)	0.95(NS)	1 (100%)	0.84(NS)	1 (100%)	0.69(NS)
	1MM(n=11)	10 (90.9%)		10 (90.9%)		8 (72.7%)	
	2MM (n=20)	18 (90%)		17 (85%)		17 (85%)	
Hepatitis C (n=239)	0MM(n=12)	12 (100%)	0.28(NS)	11 (91.6%)	0.45(NS)	10 (83%)	0.66(NS)
	1MM(n=83)	68 (81.9%)		62 (74.7%)		56 (67.5%)	
	2MM(n=144)	114 (79.2%)		104 (72%)		98 (68%)	
Hepatitis B (n=54)	0MM(n=5)	2 (40%)	0.02(*)	2 (40%)	0.02(*)	2 (40%)	0.02(*)
	1MM(n=24)	19 (79.2%)		19 (79.2%)		19 (79.2%)	
	2MM(n=25)	23 (92%)		23 (92%)		23 (92%)	
Tumores (n=58)	0MM(n=0)	0 (0%)	0.78(NS)	0 (0%)	0.52(NS)	0 (0%)	0.34(NS)
	1MM(n=22)	16 (72.7%)		14 (63.6%)		13 (59%)	
	2MM(n=36)	26 (72%)		25 (69.4%)		24 (66.7%)	
Cirrosis Alcohólica (n=144)	0MM(n=4)	4 (100%)	0.72(NS)	4 (100%)	0.49(NS)	4 (100%)	0.75(NS)
	1MM(n=54)	47 (87%)		45 (83.3%)		42 (77.8%)	
	2MM(n=86)	71 (82.5%)		67 (77.9%)		64 (74.4%)	
Cirrosis Criptogénica (n=123)	0MM(n=3)	3 (100%)	0.73(NS)	3 (100%)	0.15(NS)	1 (33%)	0.10(NS)
	1MM(n=48)	38 (79.2%)		36 (75%)		36 (75%)	
	2MM(n=72)	51 (71.4%)		43 (60%)		43 (60%)	
Hepatitis Fulminante (n=32)	0MM(n=1)	1 (100%)	0.38(NS)	1 (100%)	0.28(NS)	1 (100%)	0.28(NS)
	1MM(n=14)	7 (50%)		7 (50%)		7 (50%)	
	2MM(n=17)	7 (41.2%)		6 (35%)		6 (35%)	
Atresia Biliar (n=31)	0MM(n=2)	1 (50%)	0.40(NS)	1 (50%)	0.40(NS)	1 (50%)	0.40(NS)
	1MM(n=14)	11 (78.6%)		11 (78.6%)		11 (78.6%)	
	2MM(n=15)	12 (80%)		12 (80%)		12 (80%)	
Retrasplantes (n=95)	0MM (n=3)	0 (0%)	0.0008(*)	0 (0%)	0.005(*)	0 (0%)	0.011(*)
	1MM (n=38)	21 (55%)		18 (47.4%)		15 (39.5%)	
	2MM (n=54)	34 (62.9%)		29 (53.7%)		28 (51.8%)	
Otros (n=43)	0MM (n=0)	0 (0%)	0.21(NS)	0 (0%)	0.30(NS)	0 (0%)	0.44(NS)
	1MM (n=16)	10 (62.5%)		10 (62.5%)		9 (56%)	
	2MM (n=27)	20 (74%)		19 (70.4%)		19 (70.4%)	

NS: no significativo. El grupo "Otros" (n=43) está constituido por las patologías Cirrosis Biliar Primaria (n=36) y Colangitis Esclerosante Primaria (n=7).

Tabla R7. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en número de mismatches (MM) en el locus HLA-B.

Patología	Mismatches (MM)	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor P	Supervivencia	Valor P	Supervivencia	Valor P
Enfermedades Metabólicas y Congénitas (n=32)	0MM (n=0)	0 (0%)	0.97(NS)	0 (0%)	0.78(NS)	0 (0%)	0.95(NS)
	1MM(n=10)	9 (90%)		9 (90%)		8 (80%)	
	2MM (n=22)	20 (90.9%)		19 (86%)		18 (81.8%)	
Hepatitis C (n=239)	0MM(n=3)	3 (100%)	0.78(NS)	3 (100%)	0.76(NS)	3 (100%)	0.67(NS)
	1MM(n=78)	64 (82%)		57 (73%)		54 (69%)	
	2MM(n=158)	127 (80%)		117 (74%)		107 (67.7%)	
Hepatitis B (n=54)	0MM(n=2)	1 (50%)	0.07(NS)	1 (50%)	0.07(NS)	1 (50%)	0.07(NS)
	1MM(n=13)	13 (100%)		13 (100%)		13 (100%)	
	2MM(n=39)	30 (76.9%)		30 (76.9%)		30 (76.9%)	
Tumores (n=58)	0MM(n=2)	2 (100%)	0.68(NS)	2 (100%)	0.44(NS)	0 (0%)	0.36(NS)
	1MM(n=14)	11 (78.5%)		11 (78.5%)		11 (78.5%)	
	2MM(n=42)	29 (69%)		27 (64%)		25 (59.5%)	
Cirrosis Alcohólica (n=144)	0MM(n=5)	3 (66.7%)	0.61(NS)	3 (66.7%)	0.58(NS)	3 (66.7%)	0.57(NS)
	1MM(n=43)	38 (88%)		37 (86%)		35 (81%)	
	2MM(n=96)	80 (83%)		75 (70%)		71 (73.9%)	
Cirrosis Criptogénica (n=123)	0MM(n=3)	2 (66.6%)	0.52(NS)	2 (66.6%)	0.86(NS)	2 (66.6%)	0.89(NS)
	1MM(n=87)	65 (74%)		59 (72%)		57 (65.5%)	
	2MM(n=33)	22 (66.6%)		22 (66.6%)		21 (63.6%)	
Hepatitis Fulminante (n=32)	0MM(n=1)	1 (100%)	0.24(NS)	1 (100%)	0.24(NS)	1 (100%)	0.24(NS)
	1MM(n=10)	6 (60%)		6 (60%)		6 (60%)	
	2MM(n=21)	8 (38%)		8 (38%)		8 (38%)	
Atresia Biliar (n=31)	0MM(n=1)	1 (100%)	0.37(NS)	1 (100%)	0.30(NS)	1 (100%)	0.30(NS)
	1MM(n=14)	12 (85.7%)		9 (64%)		9 (64%)	
	2MM(n=16)	15 (93.7%)		14 (87.5%)		14 (87.5%)	
Retrasplantes (n=95)	0MM (n=2)	1 (50%)	0.96(NS)	1 (50%)	0.87(NS)	1 (50%)	0.75(NS)
	1MM (n=23)	12 (52%)		10 (43%)		9 (38.8%)	
	2MM (n=70)	46(65.7%)		42 (60%)		35 (50%)	
Otros (n=43)	0MM (n=4)	2 (50%)	0.61(NS)	2 (50%)	0.61(NS)	2 (50%)	0.61(NS)
	1MM (n=9)	7 (77%)		7 (77%)		7 (77%)	
	2MM (n=30)	22 (73%)		22 (73%)		22 (73%)	

NS: no significativo. El grupo "Otros" (n=43) está constituido por las patologías Cirrosis Biliar Primaria (n=36) y Colangitis Esclerosante Primaria (n=7).

Tabla R8. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en número de mismatches (MM) en el locus HLA-DR.

Patología	Mismatches (MM)	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor P	Supervivencia	Valor P	Supervivencia	Valor P
Enfermedades Metabólicas y Congénitas (n=32)	0MM (n=0)	0 (0%)	0.38(NS)	0 (0%)	0.76(NS)	0 (0%)	0.64(NS)
	1MM(n=14)	12 (85.7%)		12 (85.7%)		12 (85.7%)	
	2MM (n=18)	17 (94%)		16 (88.8%)		14 (77.7%)	
Hepatitis C (n=239)	0MM(n=12)	10 (83%)	0.75(NS)	10 (83%)	0.75(NS)	10 (83%)	0.51(NS)
	1MM(n=85)	62 (72.9%)		62 (72.9%)		56 (65.8%)	
	2MM(n=142)	106 (74.6%)		106 (74.6%)		99 (69.72%)	
Hepatitis B (n=54)	0MM(n=0)	0 (0%)	0.96(NS)	0 (0%)	0.96(NS)	0 (0%)	0.96(NS)
	1MM(n=25)	21 (84%)		21 (84%)		21 (84%)	
	2MM(n=29)	24 (82.7%)		24 (82.7%)		24 (82.7%)	
Tumores (n=58)	0MM(n=4)	0 (0%)	0.16(NS)	0 (0%)	0.14(NS)	0 (0%)	0.14(NS)
	1MM(n=27)	21 (77.7%)		19 (70%)		19 (70%)	
	2MM(n=27)	19 (70%)		16 (59.2%)		16 (59.2%)	
Cirrosis Alcohólica (n=144)	0MM(n=6)	6 (100%)	0.90(NS)	6 (100%)	0.86(NS)	6 (100%)	0.61(NS)
	1MM(n=57)	48 (84%)		47 (82.5%)		41 (71.9%)	
	2MM(n=81)	69 (85%)		64 (79%)		64 (79%)	
Cirrosis Criptogénica (n=123)	0MM(n=19)	18 (95%)	0.73(NS)	18 (95%)	0.67(NS)	15 (79%)	0.64(NS)
	1MM(n=61)	59 (96.7%)		54 (88.5%)		39 (69%)	
	2MM(n=43)	38 (88%)		31 (72%)		28 (65%)	
Hepatitis Fulminante (n=32)	0MM(n=0)	0 (0%)	0.36(NS)	0 (0%)	0.36(NS)	0 (0%)	0.36(NS)
	1MM(n=10)	4 (40%)		4 (40%)		4 (40%)	
	2MM(n=22)	12 (56%)		12 (56%)		12 (56%)	
Atresia Biliar (n=30)	0MM(n=1)	1 (100%)	0.59(NS)	1 (100%)	0.48(NS)	1 (100%)	0.48(NS)
	1MM(n=14)	12 (85.7%)		12 (85.7%)		12 (85.7%)	
	2MM(n=15)	15 (100%)		10 (66.6%)		10 (66.6%)	
Retrasplantes (n=95)	0MM (n=3)	0 (0%)	0.29(NS)	0 (0%)	0.19(NS)	0 (0%)	0.15(NS)
	1MM (n=42)	26 (61.9%)		25 (59.5%)		24 (57%)	
	2MM (n=50)	27 (54%)		23 (46%)		21 (41.9%)	
Otros (n=43)	0MM (n=1)	1 (100%)	0.81(NS)	1 (100%)	0.98(NS)	1 (100%)	0.98(NS)
	1MM (n=10)	9 (91.8%)		7 (70%)		7 (70%)	
	2MM (n=32)	22 (69%)		18 (68.7%)		18 (68.7%)	

NS: no significativo. El grupo "Otros" (n=43) está constituido por las patologías Cirrosis Biliar Primaria (n=36) y Colangitis Esclerosante Primaria (n=7).

3. Influencia de los anticuerpos anti-HLA preformados (pre-trasplante) sobre la supervivencia del injerto

3.1 Anticuerpos anti-HLA detectados por CDC (prueba cruzada)

En el total de trasplantes analizados (trasplantes primarios y re-trasplantes), la prueba cruzada entre suero del receptor y linfocitos T y/o B del donante, que investiga la presencia de anticuerpos preformados (pre-trasplante) donante-específicos por CDC fue negativa en 755 (89.5%) trasplantes y positiva en 89 (10.5%). La supervivencia de los aloinjertos con una prueba cruzada positiva fue significativamente inferior a la de los aloinjertos con una prueba cruzada negativa. En el grupo CDC-positivo (“crossmatch” positivo) la supervivencia a 1, 3 y 5 años fue 72%, 65% y 56% respectivamente, mientras que en el grupo CDC-negativo (“crossmatch” negativo) fue 83%, 77% y 72% respectivamente. En conjunto encontramos una asociación estadística altamente significativa entre la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados, donante-específicos, detectados por CDC en las pruebas cruzadas, y un descenso de la supervivencia a 1, 3 y 5 años ($p=0.01$, $p=0.015$ y $p=0.004$ respectivamente) (Figura R4Ay Tabla R9A).

Posteriormente, se analizó el papel de los anticuerpos preformados detectados por CDC, es decir, de las pruebas cruzadas positivas, sobre la supervivencia de los aloinjertos de forma individualizada en receptores adultos y pediátricos (Figura R4B y C, Tabla R9B y C respectivamente).

En la población adulta ($n=735$), 72 pacientes tuvieron prueba cruzada positiva (10%) y 663 tuvieron prueba cruzada negativa (90%). El patrón de supervivencias del aloinjerto fue similar al observado en la población general, con diferencias entre los

grupos CDC-negativo y CDC-positivo estadísticamente significativas a 1, 3 y 5 años ($p=0.01$, $p=0.014$ y $p=0.02$ respectivamente) (Figura R4B y Tabla R9B).

En la población de trasplantados pediátricos ($n=109$) para los cuales existían datos de prueba cruzada, 17 tuvieron prueba cruzada positiva (15.6%) y 92 negativa (84.4%). Aunque se perdió la significación estadística a 1, 3 y 5 años, probablemente por efecto de la reducción del tamaño de la muestra, la supervivencia en el grupo con anticuerpos detectados por CDC (CDC+) fue inferior a la del grupo sin anticuerpos (CDC-) (Figura R4C y Tabla R9C).

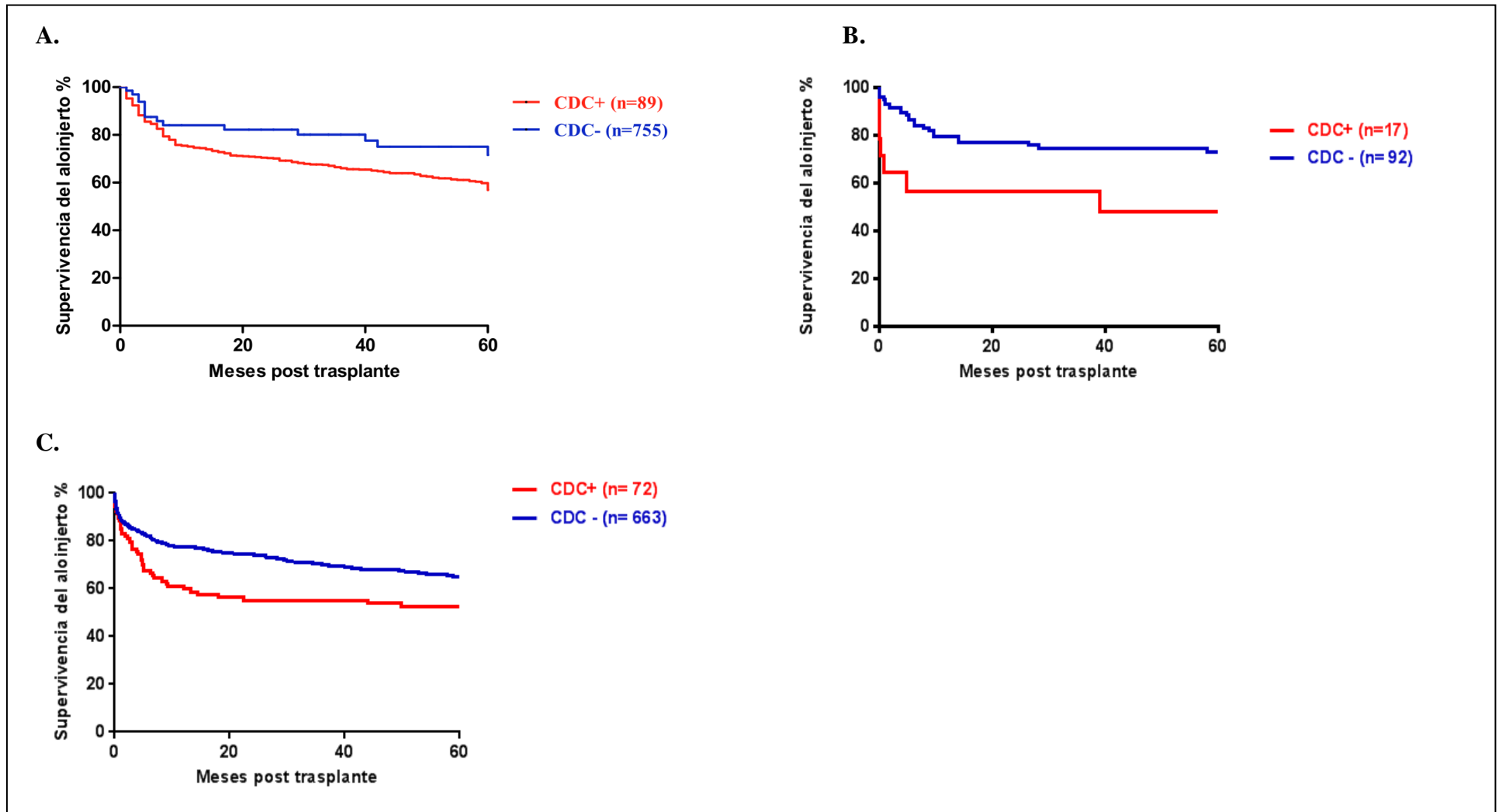


Figura R4. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con una prueba cruzada positiva (CDC+) versus aloinjertos con una prueba cruzada negativa (CDC-): A) Cohorte global (n=844), B) Adultos (n=735) y C) Pediátricos (n=109).

Tabla R9. Influencia de los anticuerpos preformados anti-HLA detectados por CDC en la supervivencia del injerto hepático.

Población	P. cruzada (CDC)	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
A) Global (n=844)	CDC- (n=755)	596 (79%)	0.01(*)	551 (73%)	0.015(*)	513 (68%)	0.004(*)
	CDC+ (n=89)	59 (66%)		53 (59%)		47 (53%)	
B) Adultos (n=735)	CDC- (n=663)	524 (79 %)	0.01(*)	484 (73 %)	0.014(*)	451 (68 %)	0.02(*)
	CDC+ (n=72)	47 (65%)		42 (58%)		38 (53%)	
C) Pediátricos (n=109)	CDC- (n=92)	75(81%)	0.08(NS)	73(79%)	0.18(NS)	66(72%)	0.51(NS)
	CDC+ (n=17)	12(70%)		12(70%)		9(53%)	

NS: no significativo.

Este mismo análisis se repitió en las hepatopatías individuales. Cuando se estratificó la población por patologías individuales, se observaron en conjunto supervivencias inferiores en los pacientes con prueba cruzada positiva. En el primer año post-trasplante, las diferencias sólo alcanzaron significación estadística en el caso de los pacientes trasplantados por un tumor hepático ($p=0.05$) (Tabla R10).

A los tres años sigue observándose en general menor supervivencia en los pacientes con CDC positivo, aunque las diferencias no alcanzan la significación en ninguna patología. (Tabla R10). Finalmente, a los 5 años post trasplante la presencia de anticuerpos preformados específicos contra el donante redujo la supervivencia sólo en receptores hepáticos trasplantados por cirrosis alcohólica ($p=0.036$) (Tabla R10).

A continuación se analizó la supervivencia en los grupos según el resultado de la prueba cruzada (positiva o negativa), y según se hubo realizado ésta sólo con linfocitos T (CDC T), ó sólo linfocitos B (CDC B).

La supervivencia de los aloinjertos con prueba cruzada positiva realizada con linfocitos T (CDC T) fue significativamente inferior que la de los aloinjertos que dieron prueba cruzada negativa al año, 3 y 5 años ($p=0.043$, $p=0.036$ y $p=0.005$ respectivamente) (Figura R5 y Tabla R11). La supervivencia de los aloinjertos con prueba cruzada positiva con linfocitos B fue también menor que la de los aloinjertos con prueba cruzada negativa, aunque las diferencias en este caso no alcanzaron significación estadística (Figura R5 y Tabla R11). Cuando se comparó la diferencia en supervivencia basado en una prueba que fue positiva tanto por linfocitos T como para linfocitos B no se alcanzaron significaciones estadísticas si bien, se observó la tendencia a una mayor supervivencia en los aloinjertos con prueba cruzada CDC T y B negativa en comparación con los aloinjertos con prueba cruzada positiva (Figura R5 y Tabla R11).

Del análisis realizado se concluye que la presencia de anticuerpos preformados (detectados por prueba cruzada con CDC) disminuye significativamente la supervivencia del aloinjerto hepático. Este efecto fue visible desde el primer año post trasplante, y en particular cuando la prueba cruzada fue positiva frente a los linfocitos T del donante.

Tabla R10. Supervivencia de los aloinjertos basada en la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA detectados por CDC.

Patología Base	Supervivencia 1 año			Supervivencia 3 años			Supervivencia 5 años		
	CDC negativo	CDC positivo	Valor p	CDC negativo	CDC positivo	Valor p	CDC negativo	CDC positivo	Valor p
Enfermedades metabólicas y congénitas	27 (97%)	2 (100%)	0.63(NS)	26 (88%)	2 (100%)	0.61(NS)	24 (80%)	2 (100%)	0.51(NS)
Hepatitis C	181 (81%)	12 (67%)	0.13(NS)	165 (75%)	11 (61%)	0.21(NS)	153 (67%)	10 (56%)	0.24(NS)
Hepatitis B	41 (84%)	4 (80%)	0.7(NS)	41 (84%)	4 (80%)	0.7(NS)	41 (84%)	4 (80%)	0.7(NS)
Tumores	40 (73%)	1 (33%)	0.05(*)	37 (67%)	1 (33%)	0.09(NS)	35 (64%)	1 (33%)	0.15(NS)
Cirrosis Alcohólica	114 (85%)	5 (71%)	0.36(NS)	109 (81%)	4 (57%)	0.12(NS)	105 (78%)	3 (43%)	0.036(*)
Cirrosis Criptogénica	67 (69%)	14 (61%)	0.43(NS)	62 (51%)	14 (61%)	0.37(NS)	62 (51%)	14 (61%)	0.37(NS)
Hepatitis Fulminante	15 (50%)	0 (0%)	0.37(NS)	14 (47%)	0 (0%)	0.39(NS)	14 (47%)	0 (0%)	0.37(NS)
Atresia Biliar	22 (79%)	3 (100%)	0.41(NS)	21 (75%)	3 (100%)	0.38(NS)	21 (75%)	3 (100%)	0.38(NS)
Cirrosis biliar primaria	23 (72 %)	2 (50%)	0.37 (NS)	23 (72 %)	2 (50%)	0.37 (NS)	23 (72 %)	2 (50%)	0.37 (NS)
Cirrosis esclerosante	5 (56%)	1 (100%)	0.4 (NS)	5 (56%)	1 (100%)	0.4 (NS)	4 (44%)	1 (100%)	0.38 (NS)
Retrasplante	58 (60%)	8 (44%)	0.11(NS)	51 (53%)	7 (39%)	0.22(NS)	47 (49%)	7 (39%)	0.28(NS)

NS: no significativo.

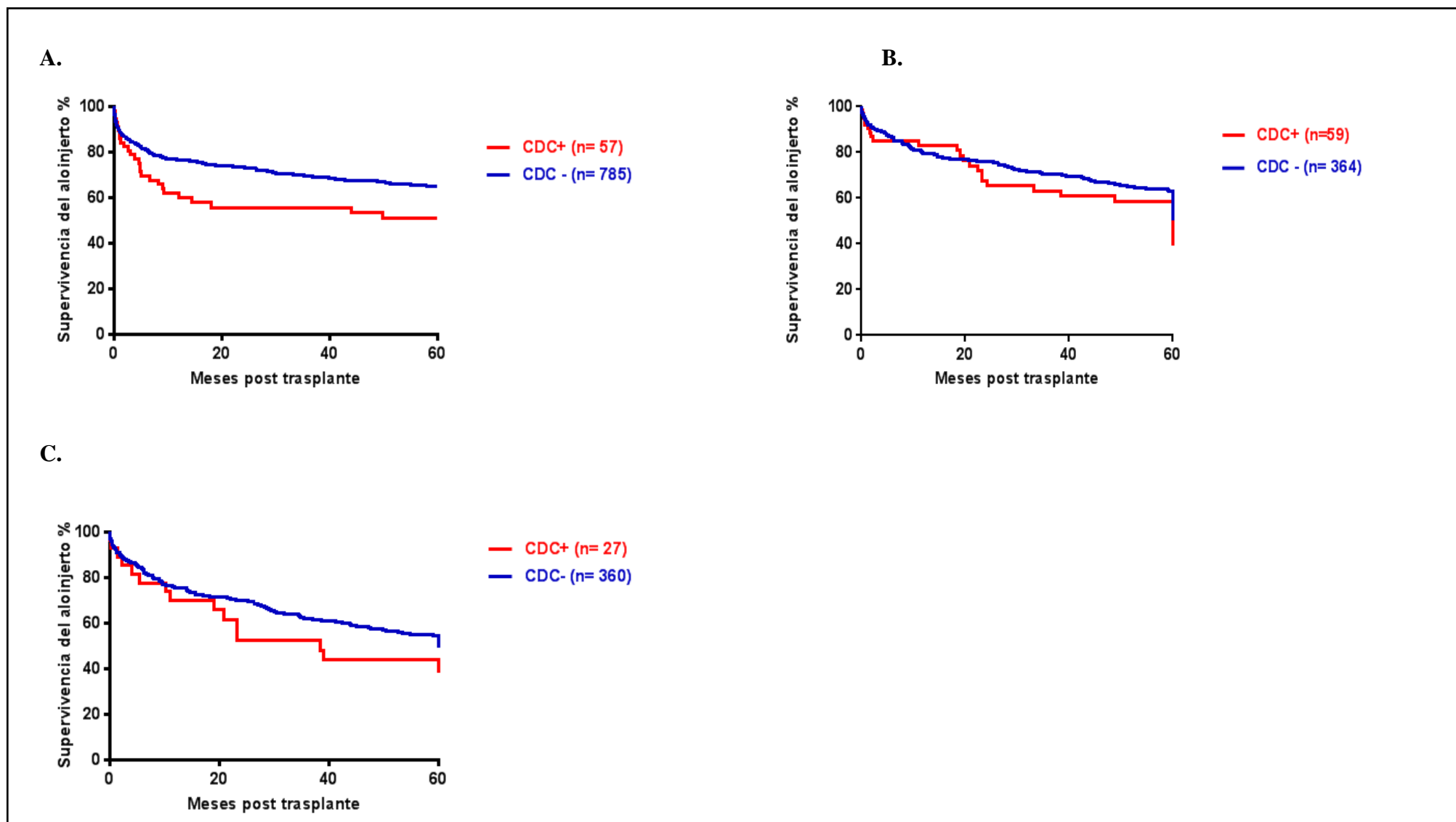


Figura R5. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con una prueba cruzada positiva (CDC+) versus aloinjertos con una prueba cruzada negativa (CDC-):
 A) CDC T (n=842), B) CDC B (n=423) y C) CDC T y B (n=387).

Tabla R11. Supervivencia de aloinjertos con anticuerpos anti-HLA detectados por CDC a 1,3 y 5 años.

Anticuerpos anti-HLA	Prueba cruzada	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
A) Clase I (CDC T) n=842	CDC- (n=785)	644(82%)	0.043(*)	604(77%)	0.036(*)	557(71%)	0.005(*)
	CDC+ (n=57)	41(72%)		31(65%)		30(54%)	
B) Clase II (CDC B) n=423	CDC- (n=364)	284(78%)	0.16(NS)	251(69%)	0.23(NS)	226(62%)	0.19(NS)
	CDC+ (n=59)	41(70%)		36(61%)		31(53%)	
C) Clase I y II (CDC T y B) n=387	CDC- (n=360)	277(77%)	0.28(NS)	248(69%)	0.24(NS)	220(61%)	0.13(NS)
	CDC+ (n=27)	18(67%)		15(56%)		12(44%)	

NS: no significativo

3.2 Anticuerpos anti-HLA preformados detectados por citometría multiparamétrica (Luminex xMAP®)

Posteriormente, la presencia de anticuerpos pre-trasplante anti-HLA de clase I y de clase II se analizó en ochocientos diez sueros (90%) del grupo original, de forma retrospectiva, con la tecnología Luminex xMAP, y se evaluó la supervivencia de los aloinjertos clasificando a los receptores de acuerdo a los resultados obtenidos. De los 810 sueros analizados, un 80% (n=646) fueron negativos para anticuerpos anti-HLA y un 20% (n=164) fueron anti-HLA de clase I y/o HLA de clase II positivos. Cuando se comparó la supervivencia actuarial entre ambos grupos, se observaron supervivencias superiores en los receptores sin anticuerpos a lo largo de los 5 años de estudio (75%, 70% y 65% a 1, 3 y 5 años respectivamente) pero la diferencia alcanzó significación estadística sólo en el primer año post trasplante ($p=0.0158$) (Figura R6A y Tabla R12).

Posteriormente, la cohorte entera se separó en grupos basados en la presencia de anticuerpos detectados por Luminex, solamente HLA de clase I, HLA de clase II o ambos (Figura R6B-D y Tabla R12). Se observó que mientras que la presencia de anticuerpos anti-clase I empeoraba significativamente la supervivencia de los aloinjertos en el primer año post-trasplante, la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA de clase II empeoraba significativamente la supervivencia de hígados trasplantados a lo largo de todo el periodo de observación (5 años).

Asimismo, cuando se comparó la supervivencia basada en la presencia conjunta de anticuerpos anti-HLA de clase I + clase II, la supervivencia en el grupo sin anticuerpos anti-HLA preformados mantuvo una supervivencia mayor durante los 5 años del estudio siendo está significativa en el primer y tercer año post-trasplante ($p=0.0018$ y $p=0.0189$ respectivamente) (Figura R6 y Tabla R12).

A continuación la cohorte se estratificó por patología base, para investigar el efecto de los anticuerpos preformados anti-HLA, detectados por citometría multiparamétrica, en las patologías individuales. En el grupo de pacientes con cirrosis alcohólica se observaron diferencias en aquellos pacientes con anticuerpos anti-HLA en comparación con aquellos sin anticuerpos preformados y estas diferencias fueron significativas a 1, 3 y 5 años (Tablas R13). Aunque en algunas patologías se observaron diferencias en el porcentaje de supervivencia, estas no llegaron a ser estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla R12. Supervivencia de aloinjertos con anticuerpos anti-HLA detectados por Luminex a 1,3 y 5 años

Luminex	1 año		3 años		5 años	
	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
Luminex I y II- (n=646)	539(83%)	0.0158(*)	498(77%)	0.11(NS)	461(71%)	0.17(NS)
Luminex I y/o II+ (n=164)	123(75%)		115(70%)		107(65%)	
Luminex I- (n=695)	577(83%)	0.038(*)	535(77%)	0.12(NS)	493(71%)	0.35(NS)
Luminex I+ (n=115)	86(75%)		80(70%)		76(66%)	
Luminex II- (n=692)	581(84%)	0.0019(*)	533(77%)	0.03(*)	498(72%)	0.038(*)
Luminex II+ (n=118)	84(71%)		79(67%)		73(62%)	
Luminex I y II- (n=646)	536(83%)	0.0018(*)	497(77 %)	0.0189(*)	459(71%)	0.06(NS)
Luminex I y II+ (n=69)	47(68%)		44(64%)		42(61%)	

NS: no significativo.

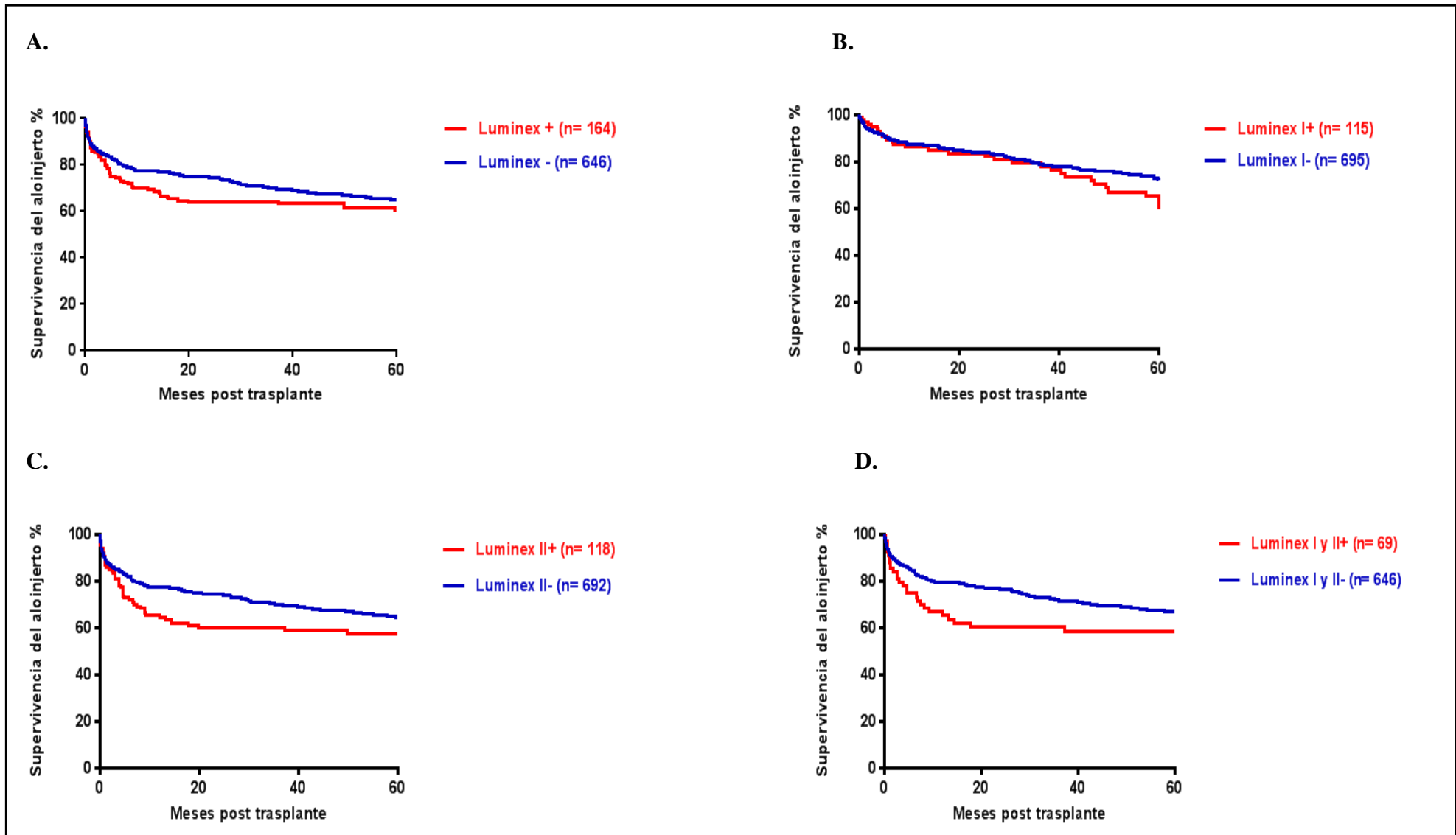


Figura R6. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con anticuerpos anti-HLA preformados (Luminex +) versus aloinjertos sin anticuerpos preformados (Luminex-): A) Luminex I y/ó (n=810), B) Luminex I (n=810) C) Luminex II (n=810) y D) Luminex I y II (n=715).

Tabla R13. Supervivencia (a 5 años) de los aloinjertos basada en la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA detectados por Luminex.

Patología Base	Supervivencia 1 año			Supervivencia 3 años			Supervivencia 5 años		
	Luminex negativo	Luminex positivo	Valor p	Luminex negativo	Luminex positivo	Valor p	Luminex negativo	Luminex positivo	Valor p
Enfermedades metabólicas y congénitas	22 (95%)	5 (71%)	0.36 (NS)	21 (91%)	5 (71%)	0.12 (NS)	20 (83%)	4 (67%)	0.38 (NS)
Hepatitis C	162 (84%)	33 (80 %)	0.67 (NS)	149 (78 %)	30 (73 %)	0.63 (NS)	133 (69 %)	27 (66 %)	0.73 (NS)
Hepatitis B	34 (81 %)	8 (89 %)	0.56 (NS)	34 (81 %)	8 (89 %)	0.56 (NS)	34 (81 %)	8 (89 %)	0.56 (NS)
Tumores	34 (71%)	9 (67%)	0.7(NS)	33 (69 %)	4 (44 %)	0.18 (NS)	31 (63 %)	4 (44 %)	0.63 (NS)
Cirrosis Alcohólica	110 (90%)	10 (63%)	0.0009 (*)	104 (85%)	9 (56 %)	0.0015 (*)	99 (81%)	7 (44%)	0.0039(*)
Cirrosis Criptogénica	57 (67%)	20 (74%)	0.37(NS)	51 (42 %)	20 (74%)	0.31(NS)	51 (42 %)	20 (74%)	0.31(NS)
Hepatitis Fulminante	7 (44 %)	10 (83 %)	0.4 (NS)	6 (38 %)	7 (58 %)	0.16 (NS)	5 (31%)	7 (58 %)	0.08 (NS)
Atresia Biliar	25 (93 %)	4 (100%)	0.68 (NS)	24 (92 %)	4 (100%)	0.62 (NS)	19 (76 %)	3 (75%)	0.98 (NS)
Cirrosis biliar primaria	16 (76%)	7 (54%)	0.27 (NS)	16 (76%)	7 (54%)	0.27 (NS)	16 (76%)	7 (54%)	0.27 (NS)
Cirrosis esclerosante	4 (57%)	3 (100%)	0.21 (NS)	3 (43 %)	3 (100%)	0.13 (NS)	2 (29 %)	3 (100%)	0.07 (NS)
Retrasplante	43 (60 %)	17 (55 %)	0.6(NS)	37 (51%)	17 (55%)	0.76(NS)	36 (49%)	15 (48%)	0.75(NS)

NS: no significativo.

Los pacientes sin anticuerpos preformados, detectados por CDC o Luminex, mostraron en todos los casos supervivencias superiores de su aloinjerto en comparación con los receptores con anticuerpos. La ausencia de anticuerpos anti-HLA de clase I donante-específicos, es decir, detectados por una prueba cruzada con linfocitos T (CDC T) mejoró significativamente la supervivencia del injerto a uno, 3 y 5 años, mientras que la presencia de anticuerpos anti-HLA de clase I, donante o no donante-específicos, es decir, detectados por Luminex (Luminex I) sólo se asoció con una supervivencia del injerto significativamente inferior en el primer año post-trasplante ($p=0.038$). No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los aloinjertos en relación con el resultado de la prueba cruzada con linfocitos B. Sin embargo la presencia de anticuerpos anti-HLA de clase II detectados por Luminex redujo la supervivencia a lo largo del estudio ($p=0.0019$, $p=0.03$ y $p=0.038$ a 1, 3 y 5 años respectivamente). Por último, la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y II detectados por Luminex redujo significativamente la supervivencia del injerto hasta los 3 años pero este efecto desaparece en el análisis a 5 años.

3.3 Concordancia entre técnicas CDC y Luminex® para la determinación de anticuerpos anti-HLA

Para determinar el grado de concordancia de resultados entre las dos técnicas empleadas para la detección de anticuerpos preformados se analizó la correlación entre anticuerpos detectados por CDC con los resultados obtenidos por Luminex. Este análisis pudo realizarse en un total de 799 receptores en los que obtuvieron datos de la prueba cruzada CDC T y Luminex para anticuerpos anti-clase I, en 400 receptores en los que se realizó la prueba cruzada CDC B y Luminex para anticuerpos anti-clase II, y en 315 receptores para los que se obtuvieron datos de prueba cruzada CDC T y B y

Luminex para anticuerpos anti-clase I y anti-clase II. En todos los casos, la correlación de resultados entre CDC y Luminex fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$. Tabla R14).

En el caso de los sueros estudiados por Luminex, los valores de corte para asignar un resultado positivo se establecieron basados en dos criterios: las recomendaciones establecidas por el fabricante y controles internos de nuestro laboratorio. En este último caso, se confirmó que los resultados de 300 sueros bien caracterizados por otras técnicas (LAT Mixed trays, One lambda) se correlacionaban bien con los resultados obtenidos por la técnica de Luminex.

Un grupo reducido de pacientes tuvo una prueba cruzada positiva por CDC, pero en esos sueros no se detectaron anticuerpos por Luminex (ver Tabla R14 sección A,B,C y D grupos de $n=22$, $n=26$, $n=28$ y $n=5$ respectivamente). Esta aparente discordancia entre las dos técnicas puede atribuirse a la presencia de anticuerpos citotóxicos anti-HLA de clase IgM, no detectables por Luminex dado que en éste se utiliza un conjugado anti-IgG, ó bien de anticuerpos citotóxicos dirigidos frente a antígenos presentes en linfocitos distintos de HLA (anticuerpos no-HLA), y que no pueden ser detectados por el ensayo de Luminex en el que las microesferas tan solo llevan unidas antígeno HLA. Por otro lado, un grupo de pacientes de $n=79$, $n=30$, $n=38$ y $n=9$ tuvieron algún tipo de anticuerpos anti-HLA detectados por Luminex pero fueron negativos en las pruebas cruzadas (Tabla R14 b,d,f,h), lo que indica mayor sensibilidad de la técnica Luminex para la determinación de anticuerpos y/o que dichos anticuerpos no son fijadores de complemento y por tanto no se ponen de manifiesto en la CDC.

Con anterioridad en este trabajo se ha demostrado que los anticuerpos anti-HLA pre-trasplante influyen negativamente en la supervivencia de los injertos hepáticos. Si los anticuerpos son detectados por prueba cruzada (CDC) su efecto es visible y

significativo desde el primer año post-trasplante y a lo largo de los 5 años de observación, mientras que si los anticuerpos se han detectado por citometría multiparamétrica su efecto deletéreo se concentra en el primer año post-trasplante (ver Resultados sección 3.1 y 3.2). Dado que se ha demostrado también una alta concordancia entre las técnicas CDC y Luminex para la detección de anticuerpos se pensó que tendría interés conocer si los anticuerpos preformados detectados solamente por Luminex tienen algún efecto sobre la supervivencia del injerto de forma independiente de la positividad CDC. Para ello se calculó y comparó la supervivencia entre estos cuatro grupos:

- Luminex clase I negativo y CDC T negativo (Tabla 14A, grupo a) versus: Luminex clase I positivo y CDC T negativo (grupo b)
- Luminex clase I negativo y CDC B negativo (Tabla 14B, grupo c) versus Luminex clase I positivo y CDC B negativo (grupo d)
- Luminex clase II negativo y CDC B negativo (Tabla 14C, grupo e) versus Luminex clase II positivo y CDC B negativo (grupo f)
- Luminex clase I+II negativo y CDC T+B negativo (Tabla 14D, grupo g) versus Luminex clase I+II positivo y CDC T+B negativo (grupo h)

En las cuatro comparaciones, la supervivencia del aloinjerto fue siempre inferior en las cohortes de Luminex-positivo versus Luminex-negativo (Tabla R15). Esta diferencia fue estadísticamente significativa en el primer año post-trasplante para los receptores con anticuerpos anti-HLA de clase II (cohortes e vs f; $p=0.038$) así como para los receptores con anticuerpos anti-HLA de clase I y II (cohortes g vs h; $p=0.0095$). Los anticuerpos anti-clase I influyen negativamente en la supervivencia

del aloinjerto aunque no de forma significativa. Estos resultados sugieren por un lado, que los anticuerpos anti-HLA de clase II resultan deletéreos para los aloinjertos por mecanismos diferentes a la activación del complemento. Por otro lado, tanto los anticuerpos anti-HLA clase II como los anticuerpos totales detectados por Luminex, podrían ser un biomarcador de utilidad para detectar los pacientes con mayor riesgo de perder sus injertos en el primer año post-trasplante.

Tabla R14. Comparación entre CDC y Luminex xMAP para la detección de anticuerpos HLA de clase I y II en receptores hepáticos.

CDC T (n=799)				
Grupo	Luminex	CDC negativo n=744	CDC positivo n=55	Valor p
A) Luminex I n=799	Luminex-negativo (n=687)	665 (a)	22	<0.0001(*)
	Luminex-positivo (n=112)	79 (b)	33	
CDC B (n=799)				
	Luminex	CDC negativo n=343	CDC positivo n=57	Valor p
B) Luminex I n=400	Luminex-negativo (n=339)	313 (c)	26	<0.0001(*)
	Luminex-positivo (n=61)	30 (d)	31	
CDC B (n=400)				
	Luminex	CDC negativo n=343	CDC positivo n=57	Valor p
C) Luminex II n=400	Luminex-negativo (n=333)	305 (e)	28	<0.0001(*)
	Luminex-positivo (n=67)	38 (f)	29	
CDC T y B (n=315)				
	Luminex	CDC negativo n=294	CDC positivo n=21	Valor p
D) Luminex II n=315	Luminex-negativo (n=290)	285 (g)	5	<0.0001(*)
	Luminex-positivo (n=25)	9 (h)	16	

Las letras a-h indican grupos de pacientes en los cuales la supervivencia del injerto se comparó y calculó (ver tabla R15) Para CDC T la prueba cruzada se realizó con linfocitos T aislados o con linfocitos totales; para CDC B la prueba cruzada se realizó con linfocitos B aislados.

Tabla R15. Comparación de la supervivencia a 1,3 y 5 años entre los grupos a-h

Grupo	Luminex y CDC	Supervivencia 1 año	Valor p	Supervivencia 3 años	Valor p	Supervivencia 5 años	Valor p
A) Grupo a vs. b	Luminex I- y CDC T - (n=665, a)	525 (79%)	0.19(NS)	492 (74%)	0.20(NS)	446 (67%)	0.54(NS)
	Luminex I+ y CDC T- (n=79, b)	58 (73%)		53 (67%)		51 (65%)	
B) Grupo c vs. d	Luminex I- y CDC B - (n=313,c)	228 (73%)	0.17(NS)	203 (65%)	0.14(NS)	178 (57%)	0.54(NS)
	Luminex I+ y CDC B- (n=30,d)	19 (63%)		16 (53%)		16 (53%)	
C) Grupo e vs. f	Luminex II- y CDC B - (n=305,e)	226 (74%)	0.038(*)	198 (65%)	0.23(NS)	174 (57%)	0.61(NS)
	Luminex II+ y CDC B- (n=38, f)	23 (59.5%)		22 (57%)		21 (55%)	
D) Grupo g vs. h	Luminex I y II - y CDC T y B - (n=285, g)	226 (79%)	0.009 (*)	200 (70.2%)	0.25(NS)	175 (61.4%)	0.58(NS)
	Luminex I y II+ y CDC T y B + (n=9, h)	5 (55.6%)		5 (55.6%)		5 (55.6%)	

NS: no significativo.

4. Relación entre los anticuerpos anti-HLA preformados y el rechazo del aloinjerto

4.1 Anticuerpos anti-HLA detectados por CDC (prueba cruzada): papel en el rechazo.

Se realizó un estudio para investigar si existía algún tipo de relación entre rechazo del aloinjerto y la presencia de anticuerpos clase I, clase II y clase I + II detectados por CDC y por Luminex.

De los 896 trasplantes estudiados, 379 (42%) tuvieron algún tipo de rechazo (agudo, crónico o mixto): 335 (37%) tuvieron episodios de rechazo agudo, 23 (2.5%) de rechazo crónico y los restantes 21 (2.3%) tuvieron una combinación de episodios de rechazo agudo y crónico (denominados rechazo mixto en este estudio) durante el periodo de estudio (Tabla R16).

Se clasificaron como “no rechazo” a aquellos pacientes que tenían una biopsia de seguimiento post trasplante normal, o que no tenían una biopsia post-trasplante pero que no presentaban alteraciones clínicas o analíticas sugerentes de rechazo. La categoría “excluidos” incluye pacientes que tuvieron una biopsia post trasplante en la que existían dudas en su clasificación y pacientes que tenían una hepatectomía o que fallecieron por fallo primario, sepsis, infartos subcapsulares, trombosis de arteria hepática, o fallo multiorgánico.

En primer lugar se estudió si existía alguna asociación entre la aparición de eventos de rechazo fuera éste global (agudo + crónico + mixto), agudo o crónico y la presencia de anticuerpos anti-HLA por CDC T, B o ambas (Tabla R17). Cuando se comparó la proporción de aloinjertos con rechazo global y anticuerpos anti-HLA de clase I detectados por CDC T, observamos que hubo una diferencia del 20% en la proporción de pacientes con rechazo entre ambos grupos que en este caso fue estadísticamente significativa ($p=0.005$). Sin embargo, cuando se hizo la misma

comparación para estudiar anticuerpos anti-HLA de clase II por CDC B no se observó un mayor número de aloinjertos con rechazo (Tabla R17).

Finalmente, cuando estudiamos la correlación con rechazo en los aloinjertos con anticuerpos anti-HLA detectados por CDC T y CDC B, también observamos un mayor número de hígados con rechazo en el grupo positivo (CDC T y B+) versus su homólogo negativo (CDC T y B-).

En la categoría de rechazo agudo (n= 335) se observaron las mismas tendencias a las previamente descritas en la categoría de rechazo global, con una mayor proporción de rechazos en aloinjertos con anticuerpos anti-HLA clase I ($p=0.016$), y anticuerpos anti-HLA clase I y II. La presencia de anticuerpos anti-HLA de clase II no pareció tener ninguna asociación con el rechazo agudo (Tabla R17).

Finalmente, cuando se repitió el análisis en rechazo crónico (rechazo crónico + mixto $n=44$) en todas las categorías (CDC T, B o ambos) el porcentaje de rechazo fue mayor en aloinjertos con anticuerpos anti HLA clase I, II o ambos. Esta asociación fue estadísticamente significativa en los grupos CDC T ($p=0.004$) y CDC T y B ($p=0.046$) (Tabla R17).

Tabla R16. Episodios de rechazo en pacientes trasplantados hepáticos

Categoría de rechazo	Número de trasplantes(n=896)	Porcentaje (%)
Rechazo Agudo	335	37.38%
Rechazo Crónico	23	2.56%
Rechazo Mixto (*)	21	2.34%
No rechazo	440	49.1%
Excluidos del estudio	77	8.6%

(*) Episodios de rechazo agudo + crónico.

**Tabla R17. Asociación entre rechazo global, agudo y crónico y CDC
(CDC T, CDC B, CDC T y B)**

I. Grupo Rechazo Global	CDC	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) CDC T (n=809)	CDC – (n=760)	339 (45%)	421	0.005(*)
	CDC + (n=49)	32 (65%)	17	
B) CDC B (n=411)	CDC – (n=355)	213 (60%)	142	0.36(NS)
	CDC + (n=56)	30 (54%)	26	
C) CDC T y B (n=374)	CDC – (n=351)	209 (60%)	142	0.34(NS)
	CDC + (n=23)	16 (70%)	7	
II. Grupo Rechazo Agudo	CDC	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) CDC T (n= 786)	CDC – (n=742)	301 (40.5%)	421 (56.7%)	0.016(*)
	CDC + (n=44)	26 (59%)	17 (38.6%)	
B) CDC B (n= 396)	CDC - (n=344)	188 (54.6%)	142 (41.3%)	0.23(NS)
	CDC + (n=52)	24 (46%)	26 (50%)	
C) CDC T y B (n= 362)	CDC - (n=342)	186 (55.3%)	142 (41.5%)	0.58(NS)
	CDC + (n=20)	12 (60%)	7 (35%)	
III. Grupo Rechazo Crónico	CDC	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) CDC T (n=482)	CDC – (n=459)	38 (8%)	421 (92%)	0.004(*)
	CDC + (n=23)	6 (26%)	17 (74%)	
B) CDC B (n=199)	CDC – (n=167)	25 (15%)	142 (85%)	0.59(NS)
	CDC + (n=32)	6 (19%)	26 (81%)	
C) CDC T y B (n=176)	CDC – (n=165)	23 (14%)	142 (86%)	0.046(*)
	CDC + (n=11)	4 (36%)	7 (64%)	

NS: no significativo.

4.2 Papel de los anticuerpos anti-HLA preformados detectados por citometría multiparamétrica (Luminex) en el rechazo.

En un segundo análisis más extenso se repitió el estudio anteriormente descrito para CDC por Luminex. En la categoría global de rechazo (rechazo agudo + crónico + mixto, n=379) se estudió la asociación entre rechazo y no rechazo en pacientes con anticuerpos anti -HLA de clase I (Luminex I), anti-HLA de clase II (Luminex II) y anticuerpos anti-HLA de clase I y II (Luminex I y II). En todos los casos el rechazo fue más frecuente en aquellos pacientes con anticuerpos. Estas diferencias alcanzaron significación estadística en los pacientes con anticuerpos Luminex clase II $p=0.002$ (Tabla R18).

En la categoría de rechazo agudo (n=335) se observaron las mismas tendencias, con una mayor proporción de rechazo en los aloinjertos con anticuerpos de clase I, clase II o ambos (Tabla R18). Al igual que se observó con el rechazo global, se encontró asociación estadísticamente significativa entre el rechazo agudo y los anticuerpos Luminex clase II ($p= 0.01$), y estuvo en el límite de la significación estadística cuando se consideraron ambos tipos de anticuerpos anti HLA (Luminex I y II; $p= 0.057$).

Finalmente, en la categoría de rechazo crónico (rechazo crónico + rechazo mixto n=44) se siguió observando una mayor tendencia a rechazo en los aloinjertos con anticuerpos anti-HLA de cualquier tipo. Sin embargo, esto no llegó a ser estadísticamente significativo en ninguno de los grupos (Tablas R18).

Tabla R18. Asociación entre rechazo global, agudo y crónico y Luminex (clase I, II y I+II)

I.Grupo Rechazo Global	Luminex	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) Luminex I (n= 728)	Luminex I- (n=674)	309 (46%)	365 (54%)	0.33(NS)
	Luminex I+ (n=106)	54 (51%)	52 (49%)	
B) Luminex II (n= 780)	Luminex II- (n=671)	297 (44%)	374 (56%)	0.002(*)
	Luminex II+ (n=109)	66 (61%)	43 (39%)	
C) Luminex I y II (n= 687)	Luminex I y II- (n=626)	278 (44%)	348 (56%)	0.052(NS)
	Luminex I y II+ (n=61)	35 (57%)	26 (43%)	
II. Grupo Rechazo Agudo	Luminex	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) Luminex I (n= 758)	Luminex I- (n=656)	274 (42%)	365 (58%)	0.43(NS)
	Luminex I+ (n=102)	48 (47%)	52 (53%)	
B) Luminex II (n= 758)	Luminex II- (n=654)	280 (43%)	374 (57%)	0.01(*)
	Luminex II+ (n=104)	61 (59%)	43 (41%)	
C) Luminex I y II (n= 670)	Luminex I y II- (n=611)	263 (43%)	348 (57%)	0.057(NS)
	Luminex I y II+ (n=59)	33 (56%)	26 (44%)	
III. Grupo Rechazo Crónico	Luminex	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) Luminex I (n= 458)	Luminex I- (n=400)	35 (8.7%)	365 (91.3%)	0.69(NS)
	Luminex I+ (n=58)	6 (10%)	52 (90%)	
B) Luminex II (n= 458)	Luminex II- (n=408)	34 (8.3%)	374	0.19(NS)
	Luminex II+ (n=50)	7 (14%)	43 (86%)	
C) Luminex I y II (n= 408)	Luminex I y II- (n=379)	31 (8.2%)	348 (91.8%)	0.68(NS)
	Luminex I y II+ (n=29)	3 (10%)	26 (90%)	

NS: no significativo.

5. Diversidad alélica de MICA en donante y receptor hepático, compatibilidad y supervivencia

En una cohorte de 33 parejas donante-receptor (66 individuos) para los cuales también había información de anticuerpos preformados anti-MICA, se estudió el genotipo, y la incompatibilidad (mismatches, MM) en los antígenos MICA entre donantes y receptores y se analizó si ésta influía en la supervivencia de los injertos hepáticos.

Los tres alelos predominantes en la cohorte fueron: MICA*008 (43.9% de la población total: 45% de los receptores, 42% de los donantes, $p=0.83$), MICA*004 (30% receptores, 33% donantes, $p=0.82$) y MICA*009 (33% receptores, 24% donantes, $p=0.64$) (Tabla R20). En dos alelos MICA se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de los donantes y los receptores: el alelo MICA*001 se encontró significativamente más representado en receptores que en donantes ($p<0.0001$) mientras que el alelo MICA*002 fue mucho más frecuente en donantes que en receptores ($p=0.01$) (Tabla R20), lo que podría sugerir que MICA*001 confiere susceptibilidad para patologías que conducen a insuficiencia hepática crónica, mientras que MICA*002 sería un alelo protector.

Por otro lado, en el conjunto de parejas donante-receptor, 12 (36%) presentaron una incompatibilidad en antígenos MICA, y 21 parejas (64%) presentaron 2 incompatibilidades (Tabla R19). No hubo ninguna pareja con compatibilidad total. El tiempo máximo de seguimiento de estos pacientes fue de 22 meses (rango 0.7-22.17 meses). A lo largo de los 22 meses de seguimiento no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia entre los grupos, aunque cabe señalar que ésta fue mayor en los aloinjertos con más incompatibilidades en MICA (95% versus 75%) (Figura R7).

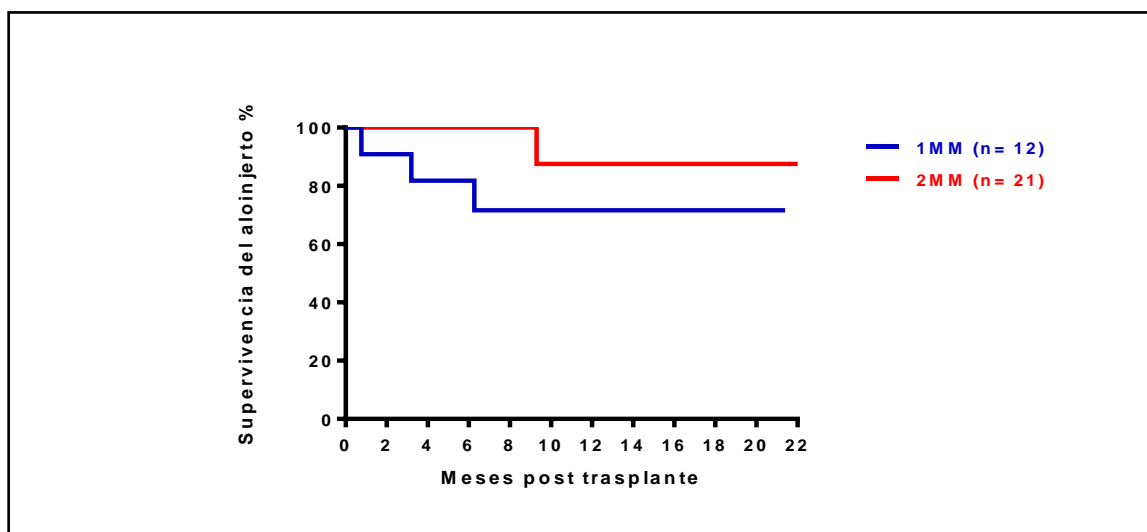


Figura R7. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en receptores hepáticos (n=33) basado en el número de incompatibilidades (mismatches) en MICA.

Tabla R19. Supervivencia actuarial en receptores hepáticos basado en el número de mismatches MICA (1MM versus 2MM) entre donante y receptor.

Mismatches (MM)	7 meses		14 meses		22 meses	
	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
1MM (n=12)	9 (75 %)	0.22(NS)	9 (75 %)	0.15(NS)	9 (75 %)	0.15(NS)
2MM (n=21)	21 (100 %)		20 (95 %)		20 (95 %)	

NS: no significativo.

Tabla R20. Frecuencia de alelos MICA en receptores y donantes

Alelo	Frecuencia en Receptores (%)	Frecuencia en Donantes (%)	Frecuencia en población	Valor p
001	8 (24%)	1 (3%)	13.6%	<0.0001()
002	2 (6%)	11 (33%)	19.6%	0.01()
*004	10 (30%)	11 (33%)	31.8%	0.82(NS)
*006	1 (3%)	0 (0%)	1.5%	-----
*007	3 (9%)	0 (0%)	4.5%	-----
*008	15 (45%)	14 (42%)	43.9%	0.83(NS)
*009	11 (33%)	8 (24%)	28.7%	0.57(NS)
*012	2 (6%)	3 (9%)	7.5%	0.66(NS)
*015	1 (3%)	0 (0%)	1.5%	-----
*016	6 (18%)	5 (15%)	16.6%	0.75(NS)
*017	0 (0%)	1 (3%)	1.5%	-----
*018	1 (3%)	3 (9%)	6%	0.32(NS)
*023	1 (3%)	0 (0%)	1.5%	-----
*027	3 (9%)	4 (12%)	10.6%	0.69(NS)
*030	0 (0%)	1 (3%)	1.5%	-----
*033	0 (0%)	1 (3%)	1.5%	-----
*046	1 (3%)	0 (0%)	1.5%	-----
*052	1 (3%)	3 (9%)	6%	0.32(NS)

NS: no significativo.

6. Influencia de los anticuerpos preformados anti-MICA en la supervivencia del injerto.

En la segunda parte del estudio, se evaluó la influencia de los anticuerpos preformados contra antígenos de moléculas no clásicas de clase I, MICA, en la evolución de los trasplantados hepáticos. Del total de 896 trasplantes estudiados, se dispuso de datos sobre anticuerpos anti-MICA en 846 trasplantes. Los trasplantes se clasificaron en MICA

positivo o negativo basados en el punto de corte de la intensidad media de fluorescencia (MFI; mean fluorescence intensity).

Para investigar si existe un efecto de los anticuerpos anti-MICA sobre la supervivencia del injerto, se comparó en primer lugar la supervivencia de injertos en pacientes con anticuerpos preformados anti-MICA frente al grupo de pacientes sin anti-MICA, tuvieran o no anticuerpos preformados anti-HLA: es decir, MICA positivo versus MICA negativo únicamente. Del total de 846 sueros estudiados, el 79% (n=671) fueron negativos para anticuerpos anti-MICA y el 21% (n=175) restante fueron positivos. La supervivencia en ambos grupos fue prácticamente la misma a lo largo del estudio. (Figura R8 y Tabla R21).

Con el fin de analizar el papel de los anticuerpos anti-MICA de forma individualizada, es decir, independiente del efecto que la presencia concomitante de anticuerpos anti-HLA en el receptor pudiera tener sobre la supervivencia del aloinjerto, se compararon a continuación las supervivencias entre dos cohortes de pacientes: 1). pacientes sin anticuerpos anti- MICA (anti-MICA negativos) que también fueron negativos para anticuerpos anti- HLA de clase I y II, y 2) receptores con anticuerpos anti-MICA (anti-MICA positivos), también negativos para HLA (Figura R8 y Tabla R21).

A lo largo del estudio, los pacientes negativos para anticuerpos anti-HLA y anti-MICA (el primer grupo de la comparación) tuvieron una supervivencia actuarial similar a los pacientes en el segundo grupo.

En análisis anteriores se demostró que la presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante en los receptores empeora la supervivencia de los aloinjertos (ver sección 3). Para evaluar si los anticuerpos anti-MICA tenían un efecto aditivo sobre la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II resultante en un empeoramiento de la

supervivencia de los injertos hepáticos, se tomaron los pacientes con anticuerpos anti-HLA I y II (detectados por Luminex) y se dividieron en dos subgrupos: 1) HLA I positivo HLA II positivo y MICA negativo (n=105), y 2) HLA I positivo HLA II positivo y MICA positivo (n=29), comparándose la supervivencia de aloinjertos entre ambos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cohortes a lo largo de los cinco años de estudio. En contra de lo que cabría hipotetizar (peor supervivencia en aquellos aloinjertos en los que además de tener anticuerpos anti-HLA tuvieran anticuerpos anti-MICA preformados) la supervivencia a los cinco años fue un 10% inferior en el grupo sin anticuerpos anti-MICA (n=105) versus el grupo con anticuerpos anti-MICA (n=29). No obstante la supervivencia actuarial en ambos grupos se mantuvo prácticamente igual a lo largo del estudio, y las diferencias entre ellos no reportaron ninguna significación estadística a 1, 3 ó 5 años. En resumen, la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados no parece influir en la supervivencia de los injertos hepáticos en la serie de pacientes que se analiza en este trabajo.

Cuatro de los pacientes en los que se detectó la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados, estaban incluidos entre las 33 parejas donante-receptor con información del genotipo de MICA. Esto permitió, tras realizar Luminex single antigen, (LSA) de las especificidades reconocidas por los anticuerpos anti-MICA, determinar si dichos anticuerpos eran donante-específicos o no donante-específicos. Los cuatro individuos estudiados mostraron anticuerpos pre-formados anti-MICA donante específicos, sin embargo en 3 de ellos el título de anticuerpos no llegó al umbral considerado como positivo. En el cuarto paciente se detectaron distintos anticuerpos anti-MICA en el suero pre-trasplante, cuatro especificidades a título alto (MICA *002, *017, *007, *015) y 3 a un título de anticuerpos intermedio (MICA *001, *012, *018).

Un antígeno MICA *027 dio como positivo (MFI > 15,000), este anticuerpo es donante específico puesto que el antígeno de MICA *008 equivale en su región extracelular a MICA *027. Todos los pacientes seguían vivos en la última revisión (Figura R9).

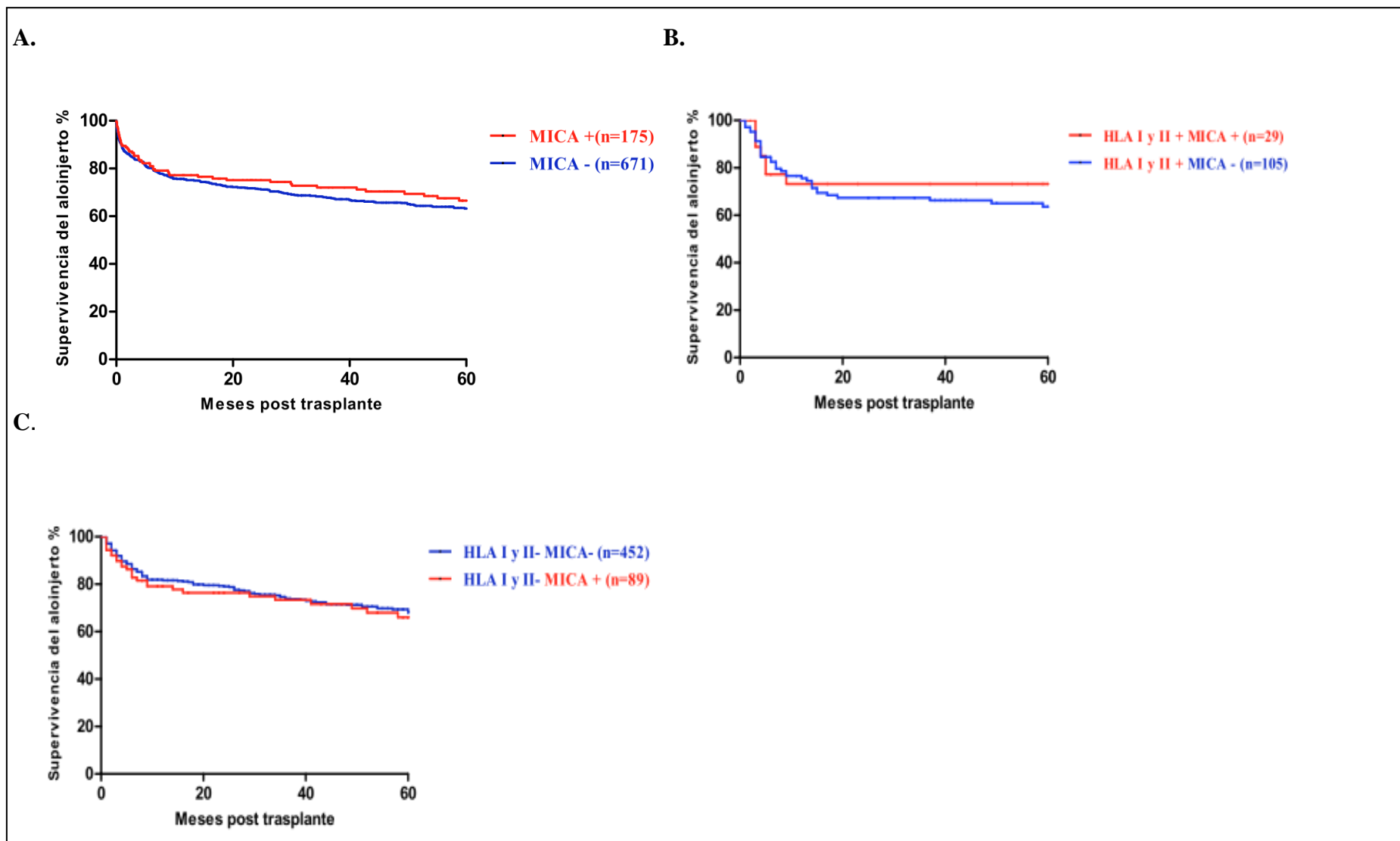


Figura R8. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en aloinjertos con anticuerpos preformados anti-HLA+/-MICA versus aquellos sin anticuerpos anti-HLA+/-anti-MICA. A) MICA (n=846), B) HLA I y II-MICA (n= 541) C) HLA I y II+ MICA (n= 134)

Tabla R21. Impacto de los anticuerpos preformados anti-MICA en la supervivencia del injerto a 1,3 y 5 años.

Grupo	Ac.MICA+/-HLA	1 año		3 años		5 años	
		Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p	Supervivencia	Valor p
A) MICA	MICA- (n=671)	522 (77.7%)	0.96(NS)	478 (71%)	0.60(NS)	442 (66%)	0.53(NS)
(n=846)	MICA+ (n=175)	137 (78%)		129 (74%)		120 (69%)	
B) HLA- y MICA	HLA I y II – y MICA - (n=452)	451 (99.8%)	1(NS)	350 (77%)	0.8(NS)	329 (73%)	0.65(NS)
(n=541)	HLA I y II – y MICA + (n=89)	89 (100%)		70 (79%)		63 (71%)	
C) HLA+ y MICA	HLA I y II + y MICA - (n=105)	104 (99%)	0.6(NS)	74 (70%)	0.8(NS)	69 (66%)	0.52(NS)
(n=134)	HLA I y II+ y MICA + (n=29)	29 (100%)		22 (76%)		22 (76%)	

NS: no significativo. Ac: anticuerpos.

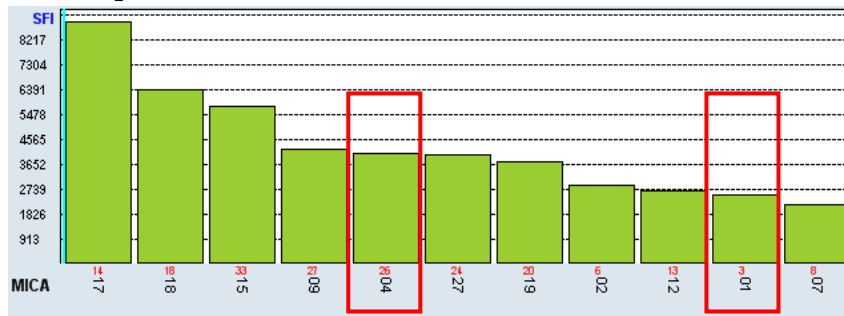
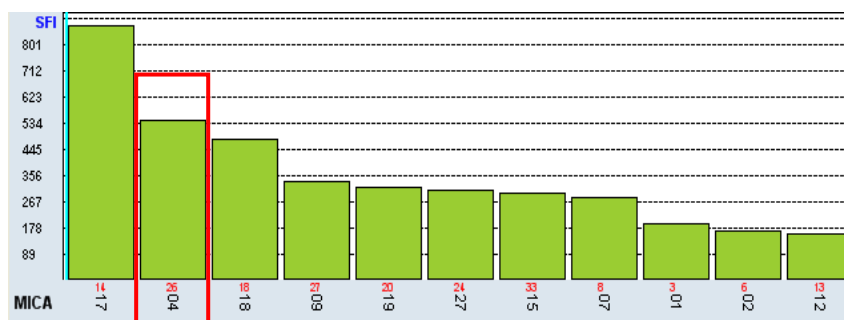
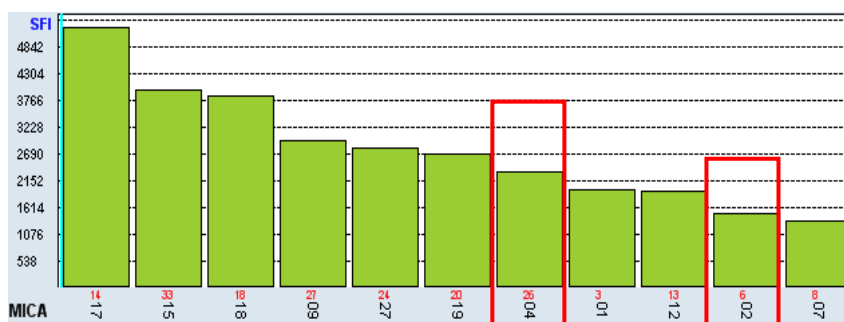
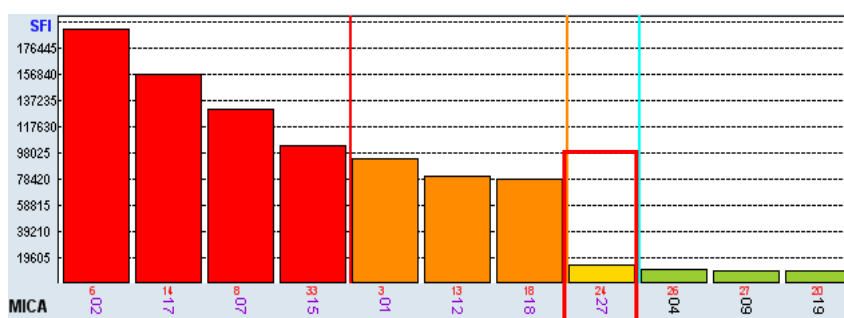
A). Receptor RHRO1551**Tipaje MICA:****Receptor: *008,*008****Donante: *001,*004****B). Receptor RHRO1572****Tipaje MICA:****Receptor: *023,*027****Donante: *004,*004****C). Receptor RHRO-1600****Tipaje MICA:****Receptor: *008,*008****Donante: *002,*004****D). Receptor RHRO-1661****Tipaje MICA:****Receptor: *009,*012****Donante: *008,*052**

Figura R9. Estudio por Luminex Single Antigen (LSA) para determinar la presencia de anticuerpos (ac) pre-formados donante específicos en el suero pre-trasplante. A-C) Receptores hepático con ac anti-MICA donante específicos a títulos por debajo del umbral de positividad. D) Receptor hepático con títulos elevados de ac anti-MICA pero que en su gran mayoría no corresponden a los del donante, excepto MICA *027 que equivale a MICA *008.

7. Relación entre los anticuerpos preformados anti-MICA y el rechazo del aloinjerto hepático.

Como se ha dicho anteriormente (punto 4) un total de 379 receptores hepáticos tuvieron al menos un episodio de rechazo. Estos pacientes se dividieron en tres grupos en función de que hubieran tenido rechazo agudo, rechazo crónico o rechazo mixto.

En un primer análisis se comparó la distribución de pacientes con y sin anticuerpos anti-MICA dentro de cada grupo de rechazo, tuvieran o no anticuerpos anti-HLA (es decir los receptores podían tener un estatus anti-HLA positivo o anti-HLA negativo) y su asociación con rechazo global (Tabla R22).

El análisis no demostró ninguna asociación estadística entre rechazo global y MICA positivo o negativo. Además, la diferencia en la proporción de rechazos fue despreciable. A continuación se repitió el mismo análisis en rechazo global pero en este caso tomando en cuenta el estatus HLA (determinado por Luminex). En un primer grupo se estudió la asociación entre rechazo global y aloinjertos con anticuerpos MICA independiente de los anticuerpos preformados anti- HLA, es decir aloinjertos que eran negativos para anticuerpos anti-HLA pero con un estatus negativo o positivo para MICA (Tabla R22).

Este mismo análisis se realizó para estudiar el efecto aditivo de los anticuerpos anti-HLA sobre los anticuerpos anti-MICA preformados (Tabla R22). En ninguno de los caso se observó una asociación estadísticamente significativa entre rechazo global y aloinjertos con anticuerpos anti-MICA preformados, tanto si esto fue independiente o con efecto aditivo de HLA (Tabla R22). Si bien es destacable, que en ambos casos la proporción de aloinjertos con rechazo fue mayor cuando existían anticuerpos anti-MICA. Esto fue especialmente aparente cuando se estudió el efecto aditivo de los anticuerpos anti-HLA sobre los anticuerpos anti-MICA resultando en una tasa de

rechazo global 15% mayor en el grupo HLA I y II+MICA+ (n=14) en comparación con el grupo HLA I y II+MICA- (n=45) (Tabla R22).

En un segundo apartado se realizó el mismo análisis previamente descrito pero en esta ocasión con el objetivo de investigar la asociación entre rechazo agudo y la presencia u ausencia de anticuerpos anti-MICA. Al igual que se hizo anteriormente, se estudió el efecto de los anticuerpos anti-MICA sin tener en consideración el estatus HLA, y posteriormente se estudió tanto el efecto independiente como el efecto aditivo de los anticuerpos anti-HLA (Tabla R22).

Los resultados en la categoría de rechazo agudo fueron similares a los obtenidos en rechazo global, puesto que no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa entre rechazo y el estatus de los anticuerpos preformados. Sin embargo, en todos los casos, en especial en el grupo donde se analizó el impacto aditivo de los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA el porcentaje de aloinjertos con rechazo fue mayor (71% versus 53%), en el grupo con anticuerpos MICA (Tabla R22).

Finalmente se repitió el análisis para estudiar si existía una asociación estadística entre rechazo crónico y el estatus de anticuerpos preformados anti-HLA y/o MICA (Tabla R22). Al igual que se observó en las otras categorías de rechazo, aunque un mayor número de aloinjertos rechazados tenían anticuerpos anti-MICA (con o sin anticuerpos anti-HLA), no se observó una asociación estadísticamente significativa en esta categoría de rechazo.

Además de estudiar la posible asociación de rechazo con anticuerpos anti-MICA y anticuerpos anti-HLA detectados por Luminex, en una muestra más pequeña se repitió el mismo análisis en este caso evaluando los anticuerpos anti-HLA detectados por prueba cruzada. Se estudio el efecto independiente de anticuerpos preformados anti-

HLA (detectados por CDC) de los anticuerpos anti-MICA, así como su efecto aditivo en el rechazo global, rechazo agudo y rechazo crónico (Tabla R23).

En línea con los resultados anteriores, observamos que los aloinjertos con anticuerpos preformados anti-MICA con o sin anticuerpos anti-HLA solían tener un porcentaje mayor de rechazo. Esto fue especialmente notable en los aloinjertos que además de los anticuerpos anti-MICA tenían anticuerpos anti-HLA. Sin embargo, tal como se había observado en el estudio anterior con Luminex, esto no llegó a adquirir ninguna significación estadística en ninguna de las categorías de rechazo (Tabla R23).

Tabla R22. Asociación entre rechazo global, agudo y crónico y HLA +/- MICA.

I. Grupo Rechazo Global	MICA	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A)	MICA- (n=641)	295 (46%)	346 (54%)	0.52(NS)
MICA (n= 788)	MICA+ (n=147)	72 (49%)	75 (51%)	
B)	HLA I y II- MICA- (n=511)	224 (44%)	287 (56%)	0.45(NS)
HLA- y MICA (n=622)	HLA I y II- MICA+ (n=111)	53 (48%)	58 (52%)	
C)	HLA I y II+ MICA- (n=45)	25 (56%)	20 (44%)	0.29(NS)
HLA+ y MICA (n=59)	HLA I y II+ MICA+ (n=14)	10 (71%)	4 (29%)	
II. Grupo Rechazo Agudo	MICA	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A)	MICA- (n=622)	263 (42%)	346 (58%)	0.39(NS)
MICA (n= 767)	MICA+ (n=145)	64 (44%)	75 (56%)	
B)	HLA I y II- MICA- (n=497)	198 (40%)	287 (60%)	0.34(NS)
HLA- y MICA (n= 607)	HLA I y II- MICA+ (n=110)	48 (44%)	58 (56%)	
C)	HLA I y II+ MICA- (n=43)	23 (53%)	20 (47%)	0.24(NS)
HLA+ y MICA (n=57)	HLA I y II+ MICA+ (n=14)	9 (64%)	4 (36%)	
III. Grupo Rechazo Crónico	MICA	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A)	MICA- (n=378)	32 (8%)	346 (92%)	0.73(NS)
MICA (n= 461)	MICA+ (n=83)	8 (10%)	75 (90%)	
B)	HLA I y II- MICA- (n=313)	26 (8.3%)	287 (91.7%)	0.92(NS)
HLA- y MICA (n=376)	HLA I y II- MICA+ (n=63)	5 (8 %)	58 (92%)	
C)	HLA I y II+ MICA- (n=22)	2 (9%)	20 (91%)	0.48(NS)
HLA+ y MICA (n= 27)	HLA I y II+ MICA+ (n=5)	1 (20%)	4 (80%)	

NS: no significativo.

Tabla R23. Asociación entre rechazo agudo ó crónico y CDC +/- MICA.

I. Rechazo Agudo	CDC y MICA	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) CDC- y MICA (n= 327)	CDC T y B- MICA- (n=262)	141 (54 %)	112 (46%)	0.31(NS)
	CDC T y B- MICA+ (n=65)	39 (60%)	23 (35%)	
B) CDC+ y MICA (n=20)	CDC T y B+ MICA- (n=17)	10 (59 %)	6 (41%)	0.89(NS)
	CDC T y B+ MICA+ (n=3)	2 (66%)	1 (34%)	
II. Rechazo Crónico	CDC y MICA	Rechazo Si	Rechazo No	Valor P
A) CDC- y MICA (n= 154)	CDC T y B- MICA- (n=128)	16 (13%)	112 (87%)	0.89(NS)
	CDC T y B- MICA+ (n=26)	3 (12%)	23 (88%)	
B) CDC+ y MICA (n= 11)	CDC T y B+ MICA- (n=9)	3 (33%)	6 (67%)	0.66(NS)
	CDC T y B+ MICA+ (n=2)	1 (50%)	1 (50%)	

NS: no significativo.

8. Expresión tisular de MICA en hígados trasplantados.

Puesto que la expresión de MICA se ve aumentada en condiciones de isquemia prolongada o estrés tisular, se estudiaron las posibles diferencias en expresión de MICA en tejido hepático procedente de injertos de donante cadáver respecto a los injertos de donante vivo. Para ello, se analizó la expresión tisular de MICA por inmunohistoquímica sobre cortes de parafina de:

- A) Cuatro cuñas hepáticas de donante cadáver, a tiempo cero (B-99-19862, B-93-24729, B-06-01452 y B-04-10885), es decir, obtenidas en el momento del trasplante.
- B) Dos biopsias hepáticas de donante vivo, a tiempo cero. Este estudio se realizó en dos sujetos que fueron considerados como posibles donantes hepáticos.

Por otro lado también se quiso analizar si el patrón de expresión de antígenos MICA sería estable en los injertos a lo largo del periodo postrasplante. Para ello comparamos la expresión MICA entre dos de los injertos hepáticos de donante cadáver estudiados con anterioridad a tiempo cero (B-99-19862 y B-93-24729) (ver punto A), y sus correspondientes hepatectomías (B-04-18122 y B-94-06656). El tiempo transcurrido entre el primer par de muestras (B-99-19862 y B-04-18122) fue de 5 años y entre el segundo par de muestras (B-93-24729 y B-94-06656) fue de 1 año.

Antes de realizar la inmuohistoquímica hepática, se testó la capacidad del anticuerpo para detectar antígenos MICA en un corte de colon humano, que se sabe que expresa constitutivamente este antígeno. La figura R10A muestra la presencia de MICA en colon detectada por el anticuerpo anti-MICA (MICA mAb clon 159207, R&D, Minneapolis, MN, EEUU) usado en este estudio. La figura R10B muestra el control negativo de la técnica.

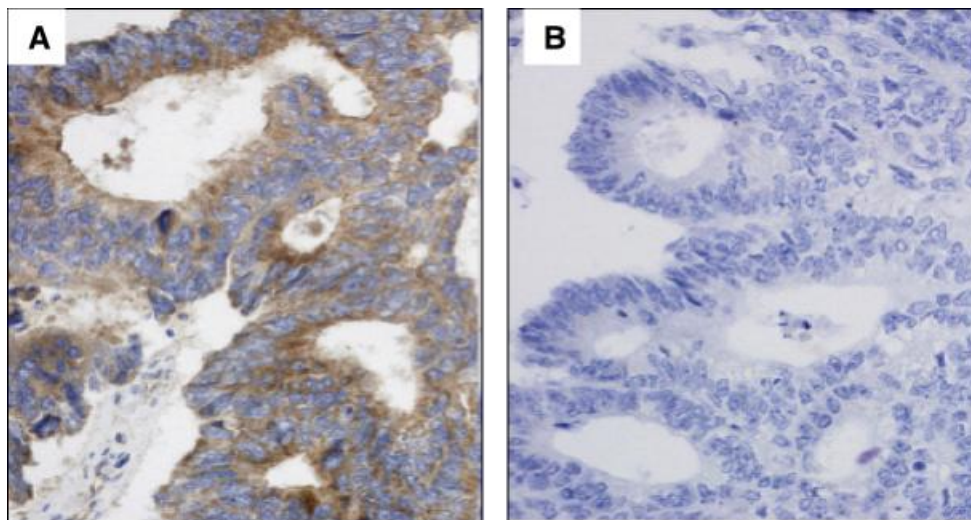


Figura R10. Detección por inmunohistoquímica de expresión tisular de MICA en muestra de colon humano incluida en parafina. A) Control positivo de colon humano teñido con MICA. B) Control negativo. (Fotos cortesía Dr Ballestín, Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Doce de Octubre).

8.1 Comparación de la expresión de MICA entre hígado de donante cadáver y donante vivo.

En las muestras correspondientes a los tejidos hepáticos de cuatro donantes cadáver obtenidos a tiempo cero del trasplante, la inmunohistoquímica mostró una intensa tinción positiva para MICA en todos ellos, con patrón citoplasmático homogéneo de los hepatocitos con refuerzo en el polo vascular y menor intensidad en el polo apical (Figura R11, A, B, C, D). Cuatro de los donantes fueron tipados para MICA, también se analizó el suero pre-trasplante correspondiente a sus receptores para averiguar la presencia o ausencia de anticuerpos preformados anti-MICA (en ambos casos el resultado fue negativo).

El análisis histopatológico de las biopsias hepáticas percutáneas obtenidas de dos sujetos sanos, evaluados como posibles donantes vivos, mostró un parénquima hepático compatible con la normalidad. Cuando los cortes se estudiaron por inmunohistoquímica para evaluar la expresión de MICA, se observaron diferencias importantes con respecto a lo observado en las muestras de donante cadáver. En primer lugar la intensidad de la tinción en las biopsias de donantes vivos fue muy inferior a las de las muestras estudiadas a tiempo cero en donante cadáver. En las biopsias de donantes vivos el patrón de tinción fue además muy diferente, ya que ésta se localizó en la membrana celular, observándose depósitos membranosos y submembranosos en el hepatocito que permiten delinearlos con nitidez, y con escasos depósitos en el citoplasma. A diferencia del patrón de tinción homogéneo observado en las biopsias procedentes de donante cadáver, en los hígados de donante vivo la tinción fue granular (Figura R11, E, F, G, H).

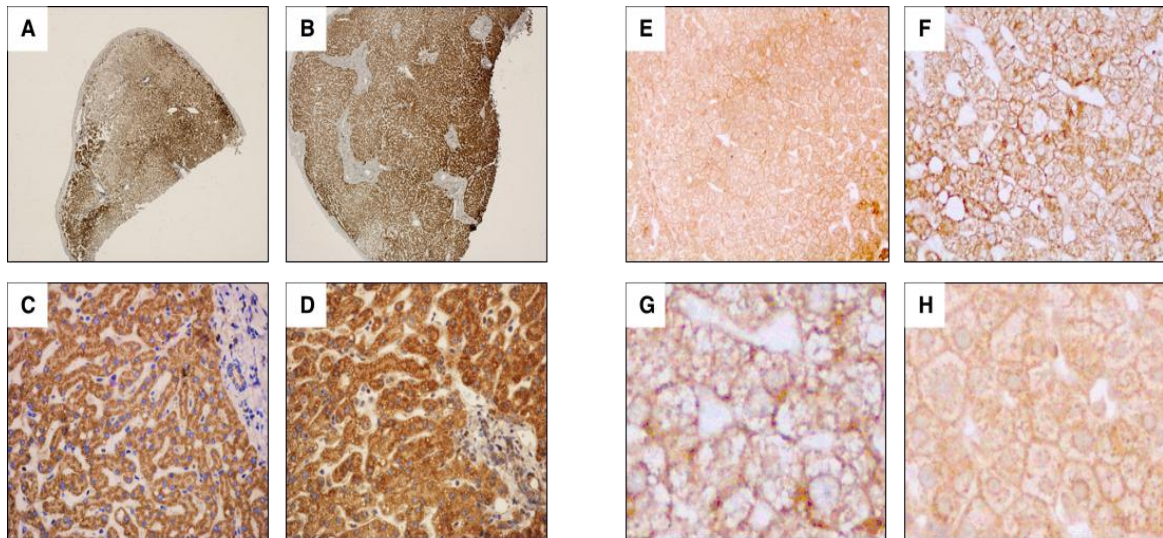


Figura R11. Expresión de MICA en hígado de donantes a tiempo cero. A y B) Dos donantes cadáver, (resolución 4x) C y D) Mismos donantes cadáver resolución 40x. E y F) Expresión de MICA en dos donantes vivos, a resoluciones 20x y 40x respectivamente. G y H) Mismos donantes vivos a resolución superior. (Fotos cortesía Dr Ballestín, Departamento de Anatomía Patológica Hospital Doce de Octubre).

La tinción de MICA en el hígado del donante cadáver se comparó con la de un hígado sano, evaluado a un tiempo equivalente (tiempo cero), pero descartado como donante y por tanto no procesado como injerto para trasplante clínico, procedente de un paciente fallecido por enfermedad respiratoria. El patrón de la expresión de MICA en hígado donante cadáver a tiempo 0 (Figura R11 C y D) es similar al del sujeto fallecido por enfermedad respiratoria (Figura R12).

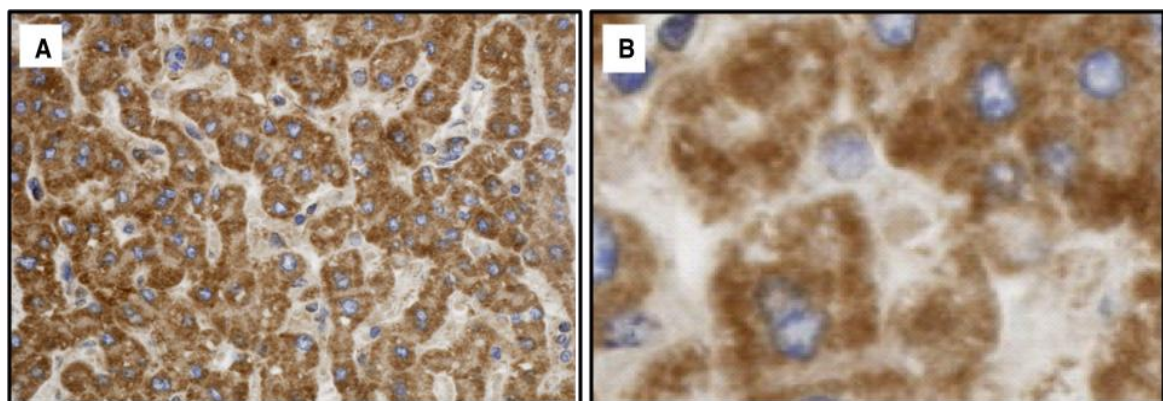


Figura R12. Expresión tisular de MICA en biopsia de hígado sano procedente de paciente fallecido por enfermedad respiratoria. A) Resolución 40x. B) Detalle de hepatocitos con tinción homogénea del citoplasma hepático

8.2 Comparación de la expresión de MICA en hígado de donante cadáver entre tiempo cero y hepatectomía.

Cuando se analizaron los cortes procedentes de los injertos hepatectomizados (B-04-18122 y B-94-06656) se observó igualmente una tinción positiva para MICA sin ninguna diferencia en el patrón respecto al descrito más arriba para las muestras obtenidas a tiempo 0. (Figura R13).

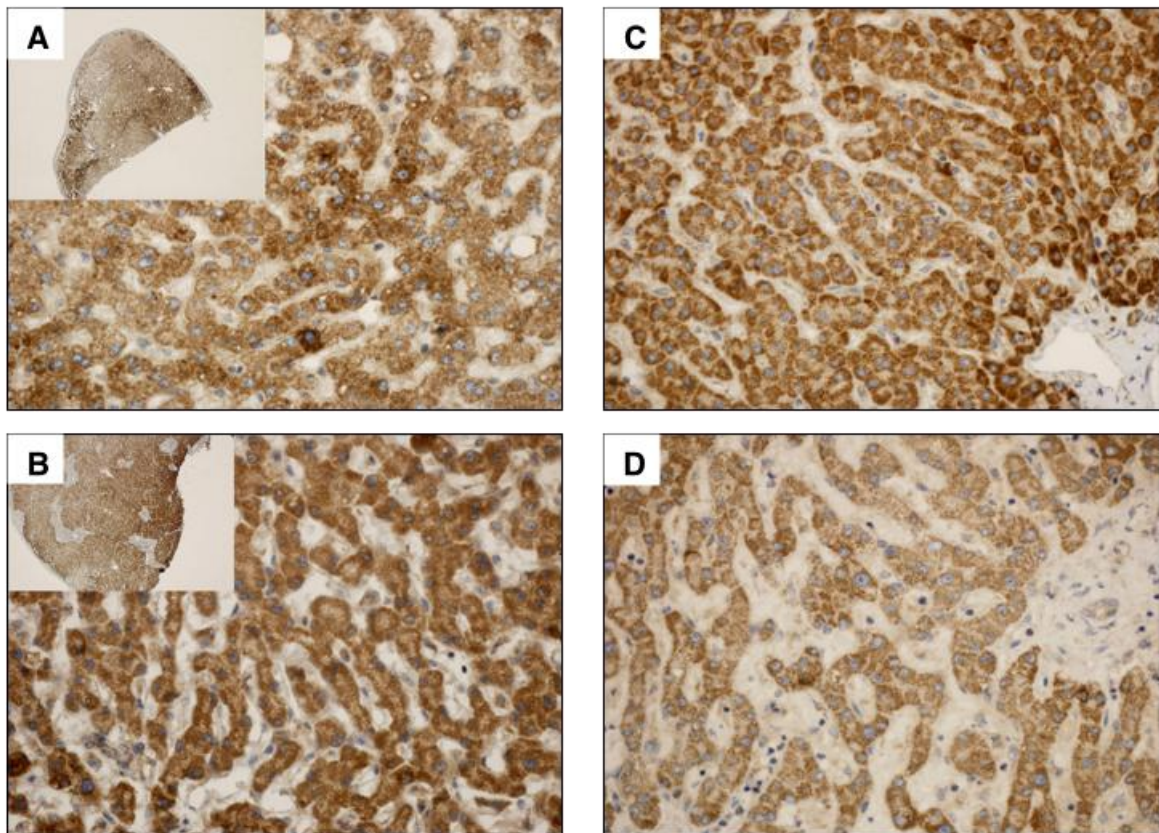


Figura R13. Expresión tisular de antígenos MICA en dos muestras de donante de hígado cadáver. A y B) Cuñas hepáticas a tiempo cero (previo a la implantación) C y D) Cuñas procedentes de la hepatectomía de los injertos originales (correspondientes a A y B respectivamente). (Fotos cortesía Dr Ballestín, Departamento de Anatomía Patológica Hospital Doce de Octubre)

Discusión

1. Variabilidad en el efecto de la compatibilidad HLA sobre la evolución del trasplante hepático

El grado de compatibilidad HLA entre donante y receptor juega un papel importante en el trasplante renal (170, 171), y cardíaco (172-174) sin embargo su efecto en el trasplante hepático siempre ha sido controvertido. Algunos estudios sugieren que la compatibilidad antigénica en parejas donante-receptor es importante para una favorable evolución del hígado trasplantado ya que aumenta la supervivencia del aloinjerto y reduce el riesgo de rechazo (175, 176). Sin embargo, varios grupos también han demostrado lo contrario (177-180) o que no tiene ningún efecto (181). En este sentido, en un trabajo pionero, Markus y colaboradores (105) encontraron resultados aparentemente discordantes al analizar una cohorte de más de 500 receptores hepáticos: los trasplantes con total compatibilidad en antígenos clase I y II mostraron una supervivencia actuarial significativamente menor que los trasplantes con una o más incompatibilidades. Por otro lado, los fracasos hepáticos debidos a rechazo se asociaron con menor grado de compatibilidad HLA mientras que los fracasos debidos a disfunción primaria del injerto fueron más numerosos en trasplantes compatibles para HLA-DR. Los autores explicaron esta discrepancia atribuyendo a la compatibilidad HLA un efecto “dual” sobre la evolución del trasplante hepático. Por un lado, la compatibilidad HLA disminuiría el rechazo de los injertos. Pero por otro, paradójicamente, y dado que las moléculas HLA son el elemento de restricción en la presentación antigénica para la estimulación del linfocito T (182) una mayor similitud entre donante y receptor podría desencadenar la disfunción del injerto por activación de mecanismos inmunológicos celulares distintos del rechazo. Esta última circunstancia sería relevante, por ejemplo, en casos de recurrencia de hepatitis víricas o de enfermedades hepáticas autoinmunes.

En aloinjertos de pacientes con una patología vírica en el órgano nativo, por ejemplo infección/hepatitis por CMV (pero también, EBV, HCV) algunos estudios sugieren que una mayor similitud antigénica en HLA de clase II entre donante y receptor se asocia a una recurrencia de la enfermedad vírica original, con posterior evolución al síndrome ductopenico o de pérdida de conductos biliares (“vanishing bile duct syndrome”) con fracaso del injerto por rechazo crónico (183-185). Otros estudios han sugerido que en los pacientes con una hepatopatía autoinmune de base, linfocitos T citotóxicos de memoria podrían reconocer los antígenos del órgano trasplantado con mayor eficacia si fueran los mismos que los del órgano nativo, pudiendo desencadenar una reacción autoinmune que culminaría con la recidiva de la enfermedad original y con la pérdida del injerto (186, 187).

En el presente estudio, una mejor compatibilidad entre donante y receptor hepático se asoció con supervivencias del injerto ligeramente superiores a 1, 3 y 5 años, tanto en la cohorte global como en adultos y niños analizados separadamente. No obstante las diferencias no alcanzaron significación estadística en ninguno de los grupos (Tabla R1). Tampoco se observaron diferencias significativas al analizar los pacientes separadamente de acuerdo a su hepatopatía original (Tabla R2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios que analizan el efecto de la compatibilidad HLA en la supervivencia del injerto hepático en cohortes amplias de pacientes. Tanto el estudio multicéntrico de UNOS (United Network for Organ Sharing database, n= 28,735) (188) como el análisis realizado por Neumann y colaboradores en la Universidad de Berlin (n=924) (189) demostraron que la compatibilidad HLA entre donante cadáver y receptor no juega un papel importante en la supervivencia del injerto. Esto mismo se ha observado en trasplante hepático procedente de donante vivo (181).

Con respecto a la población pediátrica, Francavilla y colaboradores (190) realizaron un estudio similar en 138 trasplantes hepáticos pediátricos primarios con un seguimiento mínimo de un año y evaluaron tres parámetros: la tasa de supervivencia del paciente, la del injerto y las complicaciones post trasplante más comunes. Sus resultados concuerdan con los de nuestro estudio ya que a nivel global no observaron ningún efecto de la compatibilidad antigénica en la supervivencia del paciente o del injerto. Además, tampoco reportaron diferencias relacionadas con episodios de rechazo, u otras causas de pérdida del injerto basado en los diferentes grados de compatibilidad HLA. Estudios más recientes en trasplante hepático pediátrico procedente de donante vivo también han reportado resultados similares (191).

En el presente estudio es de destacar que cuando se analizó el efecto de la compatibilidad HLA-A, -B, -DR en la supervivencia de los 95 retrasplantes, se observó la tendencia opuesta a lo observado para primeros trasplantes: la supervivencia fue superior en aloinjertos con más incompatibilidades HLA. Este efecto no alcanzó significación estadística en la cohorte global o en adultos pero fue especialmente notable en niños, ya que los tres niños retrasplantados con 0-3 incompatibilidades perdieron su injerto a los 5 años, 2 de ellos antes del primer año post-trasplante (Tabla R4).

Además de analizar el efecto de la compatibilidad HLA global, otro objetivo de esta tesis consistió en determinar si en la evolución del injerto jugaba algún papel la compatibilidad en un locus HLA particular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del trasplante entre los grupos con 0, 1 ó 2 incompatibilidades en HLA-A, -B ó -DR, ni en el análisis de la cohorte total ni en análisis individualizado de trasplantados de hígado por enfermedades metabólicas y congénitas, hepatitis C, tumores, cirrosis alcohólica, cirrosis criptogénica, hepatitis

fulminantes, atresia biliar, cirrosis biliar primaria ó colangitis esclerosante primaria. Sin embargo, en el análisis de los retrasplantes y pacientes trasplantados por infección con VHB se observaron supervivencias significativamente superiores a 1, 3 y 5 años en las parejas donante-receptor con 2 incompatibilidades en HLA-A que en parejas con 1 ó ninguna incompatibilidad (Figura R3). Es de destacar la existencia de un estudio previo de Muro y colaboradores (192) que demuestra relación entre la compatibilidad en locus HLA-A y la evolución del trasplante en el mismo sentido que lo observado en el presente trabajo. En un análisis de 224 trasplantes hepáticos por todas las causas, también en población española, el grupo de Muro observó mayor incidencia de rechazo crónico y menor supervivencia del injerto en parejas compatibles para HLA-A, y la compatibilidad en HLA-A se mantuvo como factor de riesgo independiente para la pérdida del injerto en el análisis multivariante.

En el contexto del trasplante por infección por virus de hepatitis B ó C, la literatura muestra una diversidad de resultados respecto al papel de la compatibilidad HLA en la recurrencia de la enfermedad en el hígado trasplantado y la supervivencia. Así, Neumann y colaboradores (193) defienden que una mejor compatibilidad mejora la supervivencia en pacientes trasplantados por hepatitis crónica B y observan en particular que los trasplantes con mejor compatibilidad en HLA-A y -B presentan menor tasa de reinfección por VHB. En el mismo sentido, Belli y colaboradores (194) encuentran que la incompatibilidad en el locus HLA-DRB1 aumenta, de forma independiente de otros factores, el riesgo de recurrencia de hepatitis C tras el trasplante y la evolución de ésta hacia fibrosis severa del injerto (195).

De forma contraria, otros grupos observan que la compatibilidad donante-receptor en HLA clase I se asocia con el desarrollo de lesiones hepáticas en la infección recurrente por el VHB tras el trasplante hepático (196) y en particular, que la incidencia de

recurrencia de hepatitis B y C en los hígados trasplantados es superior en situación de compatibilidad en el locus HLA-B (184).

Aunque en el presente estudio no se analiza específicamente si la compatibilidad HLA favorece o no la recurrencia de la hepatitis viral en los trasplantes y su progresión a la pérdida del injerto, es obvio que los injertos reinfectados evolucionan peor (197, 198). Por lo tanto, la relación observada entre la compatibilidad en HLA-A y peor supervivencia en los trasplantes de pacientes por infección por VHB podría atribuirse con buen nivel de certeza a que los injertos con más compatibilidad HLA-A se reinfectan más. Es bien conocido que la infección por el virus de la hepatitis B incrementa la expresión de antígenos HLA de clase I en la superficie del hepatocito (199, 200). Y se sabe también que éste virus no es citopático per sé, sino que son la respuesta frente a él y los mecanismos inmunológicos asociados los causantes del daño hepático durante la infección. Los resultados obtenidos en esta tesis apoyarían por tanto el concepto y resultados expresados al principio de esta Discusión: la coincidencia de antígenos HLA en donante y receptor supondría una “optimización” de la restricción mediada por MHC en la presentación de antígenos virales a linfocitos específicos, lo que favorecería respuestas más eficientes y robustas y probablemente más lesivas para el hígado. Por otro lado, para comprender por qué un mismo efecto (recurrencia de la infección por VHB y peor evolución del trasplante), se puede asociar a distintos genes (compatibilidad en HLA-B en el trabajo de Máñez y colaboradores y compatibilidad en HLA-A en este trabajo), debe tenerse en cuenta que los desequilibrios de ligamiento entre genes HLA y la estructura de haplotipos son en muchos casos propias y diferentes en las distintas poblaciones humanas.

En definitiva, no se puede afirmar que el papel de la compatibilidad en el sistema antigénico HLA en la evolución del trasplante hepático esté definitivamente resuelto. La diversidad de tamaños muestrales, orígenes raciales, pautas de inmunosupresión y técnicas de tipificación de antígenos son, entre muchos otros, aspectos metodológicos que impactan de forma muy importante generando una gran variabilidad en el diseño de los trabajos publicados y que impiden obtener hoy por hoy conclusiones definitivas. Para aproximarnos más a éstas, sería muy deseable la ejecución de análisis multicéntricos y amplias cohortes con procedimientos normalizados. Los datos del presente trabajo apoyan la noción de que si bien la compatibilidad HLA no parece ser un factor de primera magnitud en la evolución del trasplante hepático en general, su papel podría tener mayor relevancia en grupos diagnósticos particulares o circunstancias especiales. En esta línea es relevante considerar que la tendencia terapéutica actual es la disminución de la inmunosupresión post-trasplante para reducir los efectos secundarios asociados, y que muchos programas de trasplante se plantean incluso la retirada completa de fármacos inmunosupresores en pacientes seleccionados persiguiendo la “tolerancia operacional” (201-204). Es posible que en estas situaciones la compatibilidad HLA tenga mayor influencia, tanto en la consecución de la tolerancia como en la evolución de los pacientes tolerantes a largo plazo.

2. Papel deletéreo de los anticuerpos anti-HLA preformados

En el trasplante renal, la prueba cruzada positiva entre donante y receptor indica la existencia de anticuerpos específicos contra el donante y contraindica el trasplante, motivo por el cual dicha prueba siempre se realiza antes del mismo. Debido a la consideración tradicional de que el hígado es un órgano básicamente tolerogénico,

resistente a la respuesta inmune humoral, y más vulnerable al tiempo de isquemia, no se realiza la prueba cruzada previa al trasplante hepático, por lo que cierto número de trasplantes se realizan en pacientes con anticuerpos preformados y/o pruebas cruzadas positivas. En nuestra cohorte, un 10.5% de los pacientes se trasplantó con una prueba cruzada positiva, tasa que se encuentra en el entorno de lo reportado por otros autores (205-207).

La revisión de la literatura indica sin embargo que durante varias décadas el significado de los anticuerpos anti-HLA preformados en la evolución del trasplante hepático distó mucho de estar aclarado. Existen estudios que concluyen que la existencia de anticuerpos anti-HLA preformados no tiene ningún impacto en la supervivencia del injerto hepático ni en el rechazo agudo o crónico del mismo (179, 180, 208-211). Abundando en esta idea, se ha reportado que los trasplantes hepáticos pueden incluso “absorber” anticuerpos circulantes y proteger injertos renales trasplantados posteriormente en situación de prueba cruzada positiva (212, 213). Pero este papel protector del hígado no se observó en todos los casos (214, 215) y existen trabajos que, contrariamente a lo expuesto más arriba, sostienen que la supervivencia del injerto es significativamente mejor en pacientes con prueba cruzada negativa (176) que existen rechazos agudos con pérdida de injerto mediados por anticuerpos donante-específicos existentes previamente al trasplante (216) y que los anticuerpos anti-HLA preformados disminuyen la supervivencia del injerto, siendo este efecto observable principalmente en el primer año post-trasplante (217-221). Incluso en el trabajo de Doyle y colaboradores (197, ver más arriba), que no encuentra asociación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos preformados y peor supervivencia, observan que los aloinjertos con prueba cruzada positiva son más

propensos a desarrollar fallo del injerto por rechazo (tanto agudo como crónico), más episodios de sepsis y peor evolución, advirtiendo que este grupo de pacientes tiene mayor riesgo de complicaciones y puede requerir por tanto un seguimiento más controlado y terapia inmunosupresora más agresiva.

En relación con esta controversia debe señalarse que en los estudios ejecutados hasta el final de la década de los 90, la variabilidad en la definición del estatus de sensibilización del receptor ha dificultado la interpretación de resultados y la obtención de conclusiones definitivas. Para la identificación de anticuerpos pretrasplante se utilizó en los distintos trabajos un amplio abanico de técnicas que incluían la prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y sus variantes, la prueba cruzada por citometría de flujo (222), el panel de reactividad de anticuerpos (%PRA)(223) y ELISA (222, 224), entre otras (225). Todas estas técnicas tienen distintos niveles de sensibilidad y especificidad y no proporcionan resultados completamente equivalentes.

La serología en array de microesferas analizada por citometría de flujo (Luminex®) supuso una importante innovación técnica, útil para evaluar tanto la presencia de anticuerpos anti-HLA en el suero (“screening”) (226) como para la definición de las especificidades HLA reconocidas individualmente por los anticuerpos (“single antigen”) (227). Frente a las técnicas previas, Luminex® demostró superior homogeneidad en la detección de anticuerpos entre ensayos y entre centros, sobre todo por eliminar la dependencia entre resultado y composición de antígenos HLA en el panel de células, mayor sensibilidad, mayor especificidad por la identificación exclusiva de anticuerpos IgG frente a HLA con exclusión de IgM y autoanticuerpos, y posibilidad de detectar anticuerpos fijadores de complemento y también no fijadores pero que podrían ser clínicamente relevantes (228, 229). La identificación de especificidades

serológicas frente a antígenos HLA individuales en combinación con la información del tipaje HLA de un donante potencial antes del trasplante permite saber si los anticuerpos circulantes del receptor son donante-específicos o no donante-específicos, anticipando el resultado de la prueba cruzada. Por sus indudables ventajas, en la primera década del siglo XXI la detección de aloanticuerpos por Luminex® se implantó en la mayoría de los laboratorios de Inmunología de Trasplante, sustituyendo o complementando técnicas clásicas, y de su mano se reavivó el interés en discernir el papel de la respuesta humoral en el trasplante hepático.

En la cohorte analizada en nuestro estudio, la presencia de anticuerpos preformados donante-específicos, detectados por prueba cruzada positiva por CDC con células totales o con células T, se asoció con una disminución significativa de la supervivencia del injerto hepático desde el primer año post-trasplante y a lo largo de los 5 años de observación (Tabla R9). En receptores con estos anticuerpos, también fueron significativamente más frecuentes los eventos de rechazo de todos los tipos e individualmente de rechazos agudos y rechazo crónico. Estos resultados se observaron en la cohorte global y en la de pacientes adultos. La tendencia se mantuvo al analizar el grupo pediátrico (Tabla R9), aunque la significación estadística se perdió probablemente por efecto de la reducción del tamaño muestral. En el análisis por patología de base cabe destacar que la presencia de prueba cruzada positiva se asoció con una reducción significativa de la supervivencia del injerto, al año y cinco años respectivamente, en pacientes trasplantados por tumores hepáticos y por cirrosis alcohólica (en éstos últimos se observó el mismo efecto de los anticuerpos anti-HLA detectados por Luminex®) (Tabla R12). Estos resultados son relevantes ya que apoyan la noción del papel deletéreo de los aloanticuerpos preformados sobre el trasplante

hepático, pues estos receptores (tumores y cirrosis alcohólica) están libres, con mayor probabilidad, de otros factores de deterioro de los injertos como las recurrencias virales o de enfermedades autoinmunes.

En nuestra serie se detectaron anticuerpos anti-HLA por Luminex® en el 20% de los sueros pre-trasplante (22,2% en la serie de la Clínica Mayo publicada en 2012 (230), y 20% en la serie de Birmingham de 2013 (231). Esta cifra, que es el doble que los sujetos que se trasplantaron con prueba cruzada positiva indica, como se explica más arriba, la superior sensibilidad de la citometría multiparamétrica en su capacidad de cuantificar anticuerpos donante- (que serían los equivalentes a los detectados por prueba cruzada positiva) y no donante-específicos (que no se detectarían por la prueba cruzada), y de cuantificar anticuerpos fijadores (detectables en la prueba cruzada por CDC) y no fijadores de complemento. Nuestros resultados muestran que, de forma análoga a lo observado cuando los anticuerpos pre-trasplante se estudiaron por prueba cruzada, la presencia de anticuerpos pre-trasplante detectados por Luminex® correlaciona de forma significativa con peor supervivencia del injerto y más eventos de rechazo de todos los tipos (Tabla R18). Es muy significativo que la inmensa mayoría, si no todos, los estudios publicados con posterioridad a la obtención de estos resultados y con análisis de aloanticuerpos por array de microesferas, llegan a la conclusión de que los anticuerpos anti-HLA preformados, especialmente los donante-específicos (DSA, que no hemos analizado individualizadamente en nuestro estudio) juegan un papel deletéreo en la evolución de los injertos hepáticos. Algunos de estos estudios, y su relación con nuestros datos, se discuten a continuación.

Con respecto al rechazo agudo, se ha reportado su aparición asociada a la presencia de anticuerpos preformados donante-específicos, con depósito hepático de

C4d y con buena respuesta al tratamiento con rituximab y/o plasmaféresis, apuntando claramente a una etiología humoral (232, 233). En la serie de O'Leary y colaboradores (234) los anticuerpos preformados donante-específicos estuvieron presentes en el 60% de los pacientes con rechazo crónico y en el 41% del grupo control, y además, en el caso de los anticuerpos preformados anti-clase I, la intensidad media de fluorescencia fue superior, de forma estadísticamente significativa, en los receptores con rechazo crónico frente al grupo control. Los pacientes con anticuerpos preformados con MFI superiores a 5000 mostraron peor supervivencia que los pacientes con anticuerpos con intensidades inferiores a ese nivel, pero además, sólo el 8% de los pacientes en el grupo control tuvo anticuerpos preformados por encima de 5000, mientras que en el grupo de rechazo crónico la tasa fue del 30%. En coherencia con la observación, en nuestra serie, de que las asociaciones estadísticas entre aloanticuerpos preformados y peor supervivencia del injerto se concentran en el primer año postrasplante (Tabla R12), los estudios de Birmingham o de la Universidad de Baylor en Texas, demuestran la relación entre la presencia de anticuerpos preformados y la disfunción precoz del injerto (231, 235). En este último estudio en particular, analizando 60 pacientes con pérdidas precoces del injerto por causas inexplicables, se observó que la MFI de los DSA preformados de clase I y II era significativamente superior en los pacientes que habían experimentado rechazo agudo acreditado histológicamente por la existencia de microvasculitis y tinción de C4d difusas en comparación con los pacientes sin rechazo agudo. Musat y colaboradores (236) demuestran la relación entre los DSA clase I o clase II preformados, incluso de baja intensidad media de fluorescencia (aunque los pacientes con éstos últimos permanecían libres de rechazo por periodos más prolongados), y la aparición de rechazo agudo celular demostrado histológicamente (y con depósito endotelial de C4d en el 93% de las biopsias) y acompañado de disfunción

analítica del injerto, concluyendo que la alosensibilización humoral pretrasplante incrementa el riesgo de rechazo celular con expresión clínica y puede ser útil, por tanto, como marcador donante-específico de inmunoreactividad frente al injerto hepático. Dos estudios recientes de O'Leary y colaboradores concuerdan con nuestra observación de que son los anticuerpos anti-clase II los que se asocian con rechazo (Tabla R17). En el primero, estos autores demuestran, en un análisis multivariante, que los DSA preformados anti-clase II, en particular los de alta intensidad media de fluorescencia, son un factor de riesgo independiente para el rechazo temprano (237). En el segundo estudio, llevado a cabo en receptores de trasplante simultáneo de hígado y riñón, los DSA preformados de clase II no solamente se asociaron con mayor riesgo de rechazo y pérdida del injerto renal, sino también con mayor riesgo de rechazo y pérdida del injerto hepático y muerte del paciente (238). Por último, en un modelo de trasplante hepático alogénico en ratones deficientes en células B y T, la transferencia pasiva de aloanticuerpos frente al donante fue suficiente para desencadenar el rechazo de los injertos (239).

De acuerdo a todos estos resultados, existe en la actualidad una opinión prácticamente unánime acerca del efecto perjudicial de los anticuerpos preformados sobre el injerto hepático, y este concepto ha generado recomendaciones recogidas en guías y artículos de consenso. Ya en 2010, la guía conjunta de la Sociedad Británica de Histocompatibilidad e Inmunogenética y la Sociedad Británica de Trasplante sostiene que no está indicada la prueba cruzada prospectiva previa al trasplante hepático, pero que la detección de anticuerpos donante-específicos es útil en la identificación de pacientes con alto riesgo de rechazo agudo y puede ayudar, por tanto, al manejo post-trasplante de estos pacientes, en la adaptación de la inmunosupresión o el uso de agentes

eliminadores de anticuerpos (240). El Grupo de Consenso sobre Anticuerpos de la Transplantation Society insiste, en 2013 (225), en que la presencia de anticuerpos donante-específicos preformados es un factor de riesgo en la evolución del trasplante hepático. En el contexto técnico, esta última guía recomienda siempre la utilización de un ensayo en fase sólida (como el array de microesferas) para la detección de anticuerpos anti-HLA pretrasplante e indica que éste debería complementarse con la realización de ensayos celulares con el objetivo de encontrar la correlación entre ambos y establecer la probabilidad de la prueba cruzada con resultado positivo. Nuestro trabajo se adelantó a lo recomendado en este último punto realizando ambas técnicas y un estudio de la correlación entre la detección de anticuerpos por CDC y por Luminex®, observando una fuerte concordancia entre la CDC con linfocitos T y Luminex® para clase I, entre CDC con linfocitos B y Luminex® para clase II, y entre CDC para linfocitos T y B y Luminex® para clases I y II (Tabla R14). También es importante señalar que cuando se analizó el papel de los anticuerpos detectados por Luminex® pero acompañados de prueba cruzada negativa, la supervivencia del aloinjerto fue siempre inferior en las cohortes de Luminex-positivo versus Luminex-negativo (Tabla 15) y de nuevo las asociaciones estadísticas se concentraron sobre el papel de los anticuerpos anti-HLA de clase II y el primer año postrasplante. Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-HLA de clase II podrían resultar deletéreos para los aloinjertos por mecanismos diferentes a la activación del complemento. Por otro lado, no solamente los anticuerpos anti-HLA clase II donante-específicos (detectados en la prueba cruzada con linfocitos B), sino también los anticuerpos no donante-específicos, podrían ser un biomarcador de utilidad para detectar los pacientes con mayor riesgo de perder sus injertos en el primer año post-trasplante y personalizar su cuidado.

Es indudable que la determinación de DSA por Luminex® en nuestra cohorte, que no pudo realizarse por problemas presupuestarios, permitiría una mejor definición de las relaciones que se han encontrado. Otra limitación del presente estudio es la ausencia de un análisis multivariante que ayude a discernir si los anticuerpos anti-HLA preformados son variables de riesgo independientes. No obstante el importante tamaño de la muestra analizada, el amplio periodo de análisis, que minimiza el impacto de cambios técnicos, terapéuticos o de otra índole que se hayan podido introducir con el tiempo, y el consenso actual entre los expertos son criterios de calidad de los resultados obtenidos.

En apoyo del efecto de la inmunidad humoral sobre el deterioro del injerto hepático existe también un grupo importante de publicaciones que demuestran la influencia negativa de los anticuerpos anti-HLA *de novo*, que aparecen después del trasplante (233, 241, 242) y que sostienen incluso que la ausencia de anticuerpos es indispensable para alcanzar tolerancia operacional tras la retirada de los inmunosupresores (243, 244). Tampoco debe olvidarse el papel que pueden jugar en la evolución de los trasplantes otras respuestas de anticuerpos, por ejemplo de naturaleza autoinmune o dirigidas frente a sistemas antigénicos distintos de HLA (245-247). Entre estos últimos, el sistema antigénico MICA reviste especial importancia y es objeto de estudio en la tercera parte del presente trabajo.

3. Polimorfismo y alogenicidad de MICA en el trasplante hepático

Son varias las características del sistema y las moléculas MICA que explican el interés de entender su contribución en el contexto del trasplante. Se ha observado que

las situaciones de estrés celular, entre las que se encuentra la isquemia-reperfusión del órgano trasplantado, aumentan la expresión de MICA. El sistema genético MICA es, después del sistema HLA clásico, el que contiene un mayor número de polimorfismos alélicos. Ambos aspectos convertirían a las moléculas MICA en blanco potencial de la alorespuesta en forma de anticuerpos dirigidos frente a especificidades diferentes entre donante y receptor. Además las moléculas MICA son ligandos de los receptores NKG2D y su interacción genera señales activadoras de la función citotóxica en las células NK que podrían ser deletéreas para los injertos, mientras que de forma contraria, las moléculas MICA solubles, al bloquear y favorecer la endocitosis y degradación de NKG2D, podrían más bien favorecer la tolerancia.

En el conjunto de los 66 donantes y receptores hepáticos estudiados aquí, se detectaron 18 especificidades MICA, siendo predominantes los alelos *008, *004 y *009, de forma similar a otros estudios realizados en población española (145, 248). Al comparar las frecuencias alélicas entre donantes y receptores se observó que MICA*001 era significativamente más frecuente en receptores que en donantes, mientras que MICA*002 se distribuía de forma contraria (Tabla R24). De acuerdo a esta observación cabría deducir que mientras MICA*002 es un alelo protector, MICA*001 confiere susceptibilidad para la enfermedad hepática en general o para el progreso de las hepatopatías a estadios terminales, subsidiarios de trasplante. En concordancia con esta observación, estudios de otros autores sostienen que distintos polimorfismos de MICA determinan la persistencia viral y la evolución a hepatocarcinoma en las hepatitis por virus C (249) y por virus B (250).

Dado que tanto MICA*001 como MICA*002 pertenecen al grupo de alelos que se unen con alta afinidad a NKG2D, atribuida a la presencia del aminoácido metionina

en posición 129 (251), y que ambos pertenecen al linaje LI de acuerdo al alineamiento de las secuencias de los exones 2, 3 y 4 (252), resulta llamativo que las correlaciones de uno y otro sean en sentido opuesto. MICA *001 y *002 difieren no obstante en el número de repeticiones del microsatélite GCT del dominio transmembrana (253), y probablemente en otras propiedades moleculares, estructurales y funcionales que no se analizan en este estudio y que podrían ayudar a explicar nuestra observación.

En nuestra serie no encontramos diferencias en la supervivencia de los receptores que se trasplantaron con una o con dos incompatibilidades en MICA (Tabla R23). El tamaño de esta serie de parejas donante receptor es muy limitado y además no contamos con parejas con compatibilidad completa en los antígenos MICA. Un 21% de la cohorte presentó anticuerpos preformados anti-MICA, pero no se observó ninguna relación entre éstos y la supervivencia de los injertos hepáticos (Tabla R25), ni con la incidencia de rechazo global, agudo o crónico (Tablas R26 y 27). Estos resultados concuerdan con otro estudio similar en 123 trasplantes hepáticos en los que se evaluaron datos clínicos y patológicos de receptores hepáticos y la presencia de anticuerpos preformados anti-MICA (por Luminex). Cuando se analizó la supervivencia del receptor hepático, la pérdida del injerto, el rechazo del injerto y la función hepática no se encontraron diferencias entre los grupos de pacientes con anticuerpos preformados anti-MICA y los que no tenían anticuerpos anti-MICA (254) sugiriendo que a diferencia de otros trasplantes de órgano sólido como el riñón (255-257) o el corazón (148) (258, 259) donde sí se han visto efectos nocivos de los anticuerpos anti-MICA, éstos no parecen jugar un papel importante en el trasplante hepático. En un estudio previo (260) con una muestra más pequeña (n=84) tampoco se apreciaron diferencias en cuanto a supervivencia y rechazo entre los receptores hepáticos con o sin anticuerpos

preformados detectados por citometría de flujo en células transfectadas con antígenos MICA. Sin embargo, al igual que nosotros, observaron una tendencia a más rechazos en el grupo MICA+.

Además de analizar el efecto de los anticuerpos anti-MICA aislados, es decir, solamente en pacientes sin anticuerpos anti-HLA, se estudió si la presencia de anticuerpos anti-MICA añadida a los anticuerpos anti-HLA aumentaba el riesgo en la evolución de los trasplantes, es decir, si los anticuerpos anti-MICA tenían un efecto aditivo sobre los anticuerpos anti-HLA. El análisis se realizó considerando los anticuerpos anti-HLA detectados tanto por Luminex® cómo por prueba cruzada por CDC. Aunque las asociaciones no alcanzaron significación estadística, como ya se ha comentado, se observó una mayor tendencia a rechazo en los injertos que tenían anticuerpos anti-MICA y anti-HLA al igual que se ha descrito en la literatura de anticuerpos anti-MICA en trasplante hepático (254, 260). Sería deseable ampliar de forma suficiente el tamaño muestral y diseñar otros proyectos para aclarar definitivamente estas cuestiones. A día de hoy, y sin olvidar que los estudios son todavía escasos y mejorables metodológicamente, nuestros resultados concuerdan con lo descrito en la literatura, y puede concluirse que el significado de los antígenos MICA y la alogenicidad frente a ellos es diferente en trasplante hepático con respecto a lo observado en trasplante renal o cardíaco (151, 261, 262).

Los antígenos MICA se expresan en células endoteliales y pueden ser diana para aloanticuerpos, células NK o T efectoras con el receptor NKG2D en el trasplante de riñón. Sin embargo, la expresión de MICA en hígado normal es debatida. Algunos estudios no muestran expresión constitutiva de MICA en hígado por inmunohistoquímica (260), mientras que otros autores describen una expresión

constitutiva débil en el citoplasma del hepatocito (263). Es importante destacar que los mismos autores que describen la ausencia de MICA por inmunohistoquímica (260) comentan que una de las limitaciones de sus estudios son los resultados dispares observados en la tinción, dependiendo del anticuerpo y clon utilizado, del tipo de anticuerpo monoclonal o policlonal, de la preservación de la muestra en parafina o en secciones congeladas, y la dificultad añadida de diferenciar una tinción “real” en el citosol del “ruido de fondo” (background).

En la actualidad se considera a los antígenos MICA sensores de estrés celular por su regulación al alza por proteínas de choque térmico (264) , estrés oxidativo (156), infecciones (265) , inmunosupresores como la ciclosporina (266) o isquemia-reperusión en epitelio renal y hepatocitos humanos (267) . En nuestro análisis inmunohistoquímico observamos una expresión mucho menos intensa, y limitada a depósitos granulares en membrana y submembrana de los hepatocitos, en el hígado procedente de donantes vivos, mientras que la expresión de MICA fue intensa y abarcaba la totalidad del citoplasma en los hígados de donantes cadáver. En estudios en trasplante renal en los que compararon la regulación al alza de proteínas de choque térmico (HSP) en donantes cadáver en comparación con donantes vivos, observaron que varios factores del donante cadáver como los cambios en la circulación, pH, y estado hormonal incrementaban la expresión de HSP hasta tres veces (268). Puesto que las HSP aumentan la expresión de MICA, se podría hipotetizar que en los hígados procedentes de donantes cadáver, en relación con procesos de isquemia-reperusión probablemente más intensos que en el caso del donante vivo, se podrían haber generado más HSP generando incremento en la expresión de MICA. Es significativo que en el hígado *a priori* sano pero procedente de un paciente fallecido por enfermedad respiratoria, la expresión de MICA fue similar a la de los donantes cadáver, lo que de

algún modo viene a apoyar que los factores asociados al estrés celular (en este paciente en forma de pH extremo, toxinas, drogas e infecciones recurrentes o crónicas, (170, 171), que actúan sobre los injertos durante en el proceso de muerte y donación, incrementan la expresión de MICA en los hígados trasplantados.

Finalmente, no se observaron diferencias en la expresión de MICA en injertos de donante cadáver a tiempo cero y en el momento de la hepatectomía de los mismos órganos (estudiado en dos casos con una diferencia temporal de 1 y 5 años entre trasplante y su correspondiente hepatectomía). Para concluir que la expresión de MICA permanece estable y sin variaciones de intensidad a lo largo de todo el periodo postrasplante, sería necesaria la toma de biopsias de forma regular y utilizar técnicas que permitan cierta cuantificación de la expresión, como la PCR cuantitativa a tiempo real o el Western Blot.

Resumen en español

Introducción

Los sistemas antigénicos HLA y MICA pertenecen al Complejo Principal de Histocompatibilidad cuyos genes se localizan en el brazo corto del cromosoma 6. Las moléculas HLA participan en la presentación de antígenos extraños a linfocitos, mientras que los antígenos MICA son ligandos de células NK. Se ha observado que las moléculas de ambos sistemas pueden servir como diana antigénica en el rechazo de un órgano trasplantado.

Varios autores han descrito que la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA y anti-MICA reducen la supervivencia del aloinjerto en diferentes trasplantes de órgano sólido. En nuestro medio, los anticuerpos preformados históricamente no se han considerado como particularmente nocivos en el trasplante hepático, aunque con nuevas técnicas de detección de anticuerpos algunos autores sugieren un papel relevante.

Hipótesis

La hipótesis que se plantea es que, debido a su alto polimorfismo, los sistemas antigénicos HLA y MICA y la alorrespuesta humoral frente a ellos, contribuyen de forma desfavorable en la evolución del injerto hepático, reduciendo la supervivencia post-trasplante e incrementando el riesgo de rechazo del aloinjerto.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido valorar el papel de dos sistemas antigénicos HLA y MICA en la supervivencia y rechazo del injerto

hepático. Específicamente, en el sistema HLA valoramos la influencia de la compatibilidad antigénica global, y la compatibilidad por loci HLA individuales en la supervivencia del injerto. Otro objetivo fue el de analizar el efecto de la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados en la evolución del injerto hepático, tanto en su supervivencia como su asociación con eventos de rechazo post trasplante. También comparamos y valoramos dos técnicas de detección de anticuerpos: citotoxicidad mediada por complemento (CDC) y citometría multiparamétrica (Luminex®).

El tercer objetivo consistió en analizar la diversidad alélica de MICA en donantes hepáticos y en receptores estudiando la posibilidad de que existieran alelos protectores o nocivos. También se analizó el impacto de los anticuerpos preformados anti-MICA y su asociación con la supervivencia y el rechazo. Finalmente se investigó la expresión de MICA en el hígado y las diferencias entre hígados procedentes de donante cadáver en comparación con donante vivo, así como las diferencias en expresión del antígeno en el momento de la implantación (tiempo cero) en comparación con la hepatectomía en injertos fallidos.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se analizaron un total de 896 trasplantes hepáticos de los cuales 782 fueron trasplantes primarios y 114 retrasplantes. La cohorte estaba compuesta por un 66% de varones y un 34% de mujeres, trasplantados por enfermedad hepática irreversible. Un total de 115 trasplantes se realizaron en población pediátrica (pacientes menores de 15 años), y los restantes 781 trasplantes se realizaron en pacientes mayores de 15 años de edad.

Para determinar los antígenos HLA en receptores y donantes hepáticos se utilizaron técnicas serológicas en el caso de HLA clase I (HLA-A, -B, -C, Bw4/Bw6) y técnicas de genética molecular (PCR-SSO) o en placas con anticuerpos monoclonales en el caso de antígenos HLA de clase II (HLA-DR, -DQ). El genotipaje de antígenos MICA se realizó por la técnica Luminex® de tipificación inversa de ADN de SSO (LABType SSO). La presencia de anticuerpos preformados anti-HLA se detectó por dos técnicas: citotoxicidad mediada por complemento (CDC) y por citometría multiparamétrica Luminex® xMAP. Esta segunda técnica también se utilizó para la detección de anticuerpos preformados anti-MICA. Adicionalmente al estudio cuantitativo de anticuerpos, se realizó un análisis cualitativo más sensible de anticuerpos anti-MICA donante específicos por el ensayo LABScreen® Single Antigen. Finalmente, la expresión de antígenos MICA se determinó en biopsias hepáticas por inmunohistoquímica.

Resultados y Discusión

El análisis en el que se comparó el grado de supervivencia del injerto hepático basado en el número de incompatibilidades (mismatches) antigénicas HLA entre el donante y receptor no demostró una supervivencia mayor en las parejas donante-receptor más compatibles. Sin embargo, cuando se estudió la compatibilidad antigénica por locus HLA se observó, en pacientes retrasplantados y en receptores con hepatitis por virus B, que la presencia de 2 mismatches en el locus A aumentaba significativamente la supervivencia a 1, 3 y 5 años.

Posteriormente se procedió a valorar mediante estudio tanto por microlinfocitotoxicidad estándar como por citometría multiparamétrica (Luminex xMAP) la relación entre la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados y la supervivencia del injerto hepático a uno, tres y cinco años post trasplante. Se observó que tanto en la cohorte global, como estratificada en población pediátrica y población adulta la presencia de anticuerpos preformados disminuía la supervivencia del injerto a largo plazo. Específicamente, encontramos una correlación estadística significativa entre la presencia de anticuerpos donante-específicos, detectados por CDC (prueba cruzada positiva) y una supervivencia inferior a 5 años, tanto en la población global ($p=0.004$), como en la adulta ($p=0.02$). Aunque la significación estadística se perdió en la población pediátrica, posiblemente debido al tamaño de la cohorte, siguió observándose una tendencia a una menor supervivencia en los receptores con anticuerpos preformados. El mismo análisis se repitió estratificando la población por patologías individuales, y aunque en conjunto no se observaron asociaciones estadísticas significativas (excepto en pacientes con tumores hepáticos en el primer año y cirrosis alcohólica en el tercer año), los receptores con anticuerpos preformados mostraron una supervivencia inferior a aquellos sin anticuerpos preformados.

Observamos que en todos los casos, los receptores con anticuerpos anti-HLA preformados detectados por citotoxicidad dependiente del complemento (anticuerpos anti-HLA de clase I (CDC con linfocitos T), de clase II (CDC con linfocitos B) y ambos (CDC T+B) tenían una supervivencia inferior a los receptores sin anticuerpos (prueba cruzada CDC T, CDC B ó CDC T+B negativa). Esto fue estadísticamente significativo en CDC T a 1, 3 y 5 años ($p=0.043$, $p=0.036$ y $p=0.005$ respectivamente).

Este mismo estudio se volvió a repetir tras analizar los anticuerpos preformados por citometría multiparamétrica (Luminex xMAP). Los resultados obtenidos confirmaron lo observado en el análisis por CDC. En todos los casos la presencia de anticuerpos tuvo un efecto negativo sobre la supervivencia del injerto, llegando a ser estadísticamente significativo en el primer año para anticuerpos anti-HLA clase I (Luminex I; $p = 0.038$) y a uno, tres y cinco años para anticuerpos anti-HLA clase II (Luminex II; $p = 0.0019$, $p=0.03$ y $p=0.038$ respectivamente). También fue significativo para la población con anticuerpos anti-HLA I+II a 1 y 3 años (Luminex I+II; $p = 0.0018$ y $p= 0.0189$ respectivamente).

En una segunda parte, se valoró si existía una asociación entre la presencia de anticuerpos preformados HLA de clase I, clase II ó clase I y II y una mayor proporción de casos de rechazo alógeno. Al igual que se hizo anteriormente, se estudió esta asociación tanto en receptores que tenían una prueba cruzada positiva por CDC como en receptores que tenían anticuerpos preformados detectados por Luminex xMAP. En el primer caso se observó que en los pacientes con anticuerpos anti-HLA clase I (prueba cruzada CDC T positiva) existía una mayor proporción de receptores con rechazo global, agudo y crónico con respecto a los que tenían una prueba cruzada CDC T negativa ($p=0.005$). Esta diferencia fue estadísticamente significativa en todos los tipos de rechazo. Cuando se repitió el estudio considerando la prueba cruzada con linfocitos B (CDC B), también se observó un mayor número de rechazos (rechazo global, agudo ó crónico) en aquellos receptores con anticuerpos anti-HLA clase II (prueba cruzada positiva) en comparación con aquellos sin anticuerpos. Sin embargo en este caso las diferencias no fueron significativas en ningún caso. Finalmente, se estudió la correlación entre anticuerpos preformados clase I y II (CDC T y B) y rechazo y también se observó un mayor número de receptores con anticuerpos y rechazo alógeno.

Cuando se repitió el análisis por Luminex xMAP se obtuvieron resultados similares. En todos los casos (Luminex I, II ó I+II) los receptores con anticuerpos preformados tuvieron más episodios de rechazo (global, agudo ó crónico). La correlación entre anticuerpos HLA de clase II (Luminex II) y rechazo fue estadísticamente significativa en rechazo global ($p=0.002$) y rechazo agudo ($p=0.01$).

En la tercera parte del trabajo de Tesis Doctoral se evaluó el papel de los antígenos MICA en el trasplante hepático. En primer lugar, se analizó la diversidad alélica en una cohorte de parejas donante-receptor. Se observó que el alelo MICA*001 era predominante en receptores y el alelo MICA*002 en donantes lo cual podría sugerir que MICA*001 confiere susceptibilidad para enfermedad hepática o para su evolución a estadios terminales, y MICA*002 es un alelo protector. Al igual que se había hecho con los antígenos HLA evaluamos si la compatibilidad antigénica MICA jugaba un papel en la supervivencia del injerto. Aunque este estudio se realizó en una cohorte pequeña, ($n=33$ pacientes), nuestros resultados demostraron una tendencia hacia una mayor supervivencia en aquellos receptores que tenían una mayor incompatibilidad antigénica en MICA con su donante en comparación con aquellas parejas donante-receptor más compatibles.

Posteriormente se analizó si los anticuerpos preformados anti-MICA jugaban un papel en la supervivencia del aloinjerto hepático. En este caso, se observó que los anticuerpos MICA preformados no jugaban un papel particularmente relevante en la supervivencia del aloinjerto. Cuando se estudió la correlación entre anticuerpos anti-MICA con el rechazo allogénico tampoco se observó ninguna diferencia entre los grupos, sugiriendo que los anticuerpos MICA pretrasplante no juegan un papel importante en el trasplante hepático. Finalmente, se valoró la expresión del antígeno MICA en biopsias hepáticas procedentes de donante vivo y donante cadáver, así como

en biopsias obtenidas en diferentes momentos del trasplante (en el momento de la implantación en comparación con el momento de la hepatectomía). El nivel de expresión hepática en las biopsias procedentes de donante vivo fue inferior al del expresado en biopsias procedentes de donante cadáver lo que podría sugerir que en el segundo grupo hay mecanismos de estrés celular (muerte, mayor tiempo de isquemia) que regulan la expresión al alza de MICA en comparación con el primer grupo. En el segundo estudio en el que se comparó la expresión de MICA en biopsias recogidas en el momento de la implantación y biopsias recogidas durante la hepatectomía no se observaron diferencias de expresión en el tejido.

Conclusiones

En conclusión, el resultado principal obtenido en esta Tesis Doctoral es que la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA juega un papel significativo en la supervivencia del aloinjerto hepático y el rechazo, mientras que la presencia anticuerpos anti-MICA no parece jugar un papel relevante en la evolución del aloinjerto hepático. Por tanto, la determinación de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante, bien por prueba cruzada por CDC o por citometría multiparamétrica, podría ayudar a estratificar los pacientes con riesgo de forma anticipada y permitir una vigilancia más estrecha de los mismos.

Resumen

en inglés

Background

The HLA and MICA antigen systems belong to the Major Histocompatibility Complex found on the short arm of chromosome 6. HLA molecules participate in the presentation of foreign antigen to lymphocytes, whereas MICA antigens are NK cell ligands. Both types of molecules can function as antigenic targets in allograft rejection.

Several authors have described that preformed anti-HLA and anti-MICA antibodies reduce allograft survival in solid organ transplants. In the context of liver transplantation, preformed antibodies have not been considered detrimental in transplant outcome however, with the advent of newer and more sophisticated technology in the detection of preformed antibodies some authors have begun to question the status quo.

Hypothesis

The hypothesis proposed is that, due to their high degree of polymorphism, the HLA and MICA antigenic systems and the humoral alloresponse against them, contribute negatively in hepatic allograft outcome reducing post-transplant survival and increasing the risk of allograft rejection.

Objectives

The main aims of this doctoral thesis were to evaluate two antigen systems (HLA and MICA) and their impact on the survival and rejection of liver allografts. Specifically in the HLA system we were interested in evaluating the impact of overall antigen compatibility as well as antigenic compatibility by individual HLA loci on

allograft survival. Another aim was to analyze the effect of the presence of preformed anti-HLA antibodies on the outcome of liver transplantation, as well as its association with allograft rejection. We also evaluated and compared two techniques used in the detection of antibodies: complement dependent cytotoxicity (CDC) and multibead array (Luminex xMAP®).

The third aim was focused on the MICA antigen system, specifically we analyzed the allelic diversity of MICA in a cohort of donor-recipient pairs to evaluate its distribution as compared to a normal Mediterranean population, we were also interested in evaluating if specific MICA alleles conferred a survival advantage to donors or recipients. The impact of preformed anti-MICA antibodies was also evaluated, as well as its association with survival and allograft rejection. Finally, we evaluated the expression of MICA antigen in liver from deceased donors and living donors, as well as documenting differences observed at different time points throughout the transplant process (for example, biopsies taken at implantation versus hepatectomy specimens of failed grafts).

Materials and Methods

A retrospective analysis of a total of 896 liver transplants was performed. Of this total, 782 were primary transplants and 114 retransplants. The cohort consisted of 66% males and 34% females on the transplant waiting list for end stage liver disease. A total of 115 transplants were performed on a pediatric population under the age of 15, and the remaining 781 were performed in recipients above the age of 15.

Serological techniques were utilized to determine the HLA antigens in hepatic recipients and donors in the case of HLA class I antigens (HLA-A,-B, -C, Bw4/Bw6), molecular typing techniques (PCR-SSO) or typing trays with monoclonal antibodies were used to determine HLA class II antigens (HLA-DR, DQ). The genotype of MICA antigens was defined using LABTypeSSO which applies Luminex xMAP technology to the reverse SSO DNA typing method. Additionally, preformed anti-HLA antibodies were determined using two techniques: the conventional complement dependent cytotoxicity assay (CDC) and the more novel multiparametric cytometry assay (Luminex xMAP). The second technique was also used for the detection of preformed anti-MICA antibodies. Aside from the quantitative analysis of antibodies a more sensitive qualitative assay was performed to detect MICA donor specific antibodies (LABScreen® Single Antigen). Finally, the expression of MICA antigens was determined in biopsy samples using immunohistochemistry techniques.

Results and Discussion

When we compared the survival of hepatic allografts based on the number of HLA mismatches between donor-recipient pairs we found that there was no difference in survival in the allografts belonging to the most compatible versus the most incompatible (mismatched) pairs. However, when HLA compatibility was stratified by individual loci and pathology we observed that, in patients with Hepatitis B or retransplanted recipients, the presence of two mismatches in the HLA-A locus significantly increased survival at 1,3 and 5 years.

Next we evaluated the influence of preformed anti-HLA antibodies on liver allograft survival at one, three and five years. Two antibody detection techniques were used: standard microlymphocytotoxicity (CDC) and a novel multiparametric cytometry assay (Luminex xMAP). When the cohort was analyzed as a whole (global population), as well as when it was stratified into adult and pediatric groups, the presence of preformed antibodies decreased survival of the allograft long term. Specifically, we found that when we compared survival of recipients in the global population, there was a statistically significant correlation with decreased survival at 5 years in patients with preformed donor specific antibodies (detected by CDC crossmatch) as compared to patients without antibodies; in the global population ($p=0.004$) and adult populations ($p=0.02$). Although differences in survival were still observed between the allografts with preformed antibodies in comparison to those without antibodies, the statistical significance previously observed was lost in the pediatric group; probably as a result of a reduction in the total number of patients. The same analysis was performed stratifying the population by underlying pathology. Overall we observed a decrease in survival in allografts with preformed antibodies in all diagnostic groups. However, this was only statistically significant in patients with an underlying diagnosis of hepatocellular carcinoma in the first year post transplant and patients with alcoholic liver cirrhosis in the third year.

We observed that in all cases, recipients with preformed anti-HLA antibodies detected by complement dependent cytotoxicity (anti-HLA class I (CDC with T lymphocytes), class II (CDC with B lymphocytes) or class I+II (CDC with T+B lymphocytes) had an inferior survival when compared to recipients without antibodies (CDC T, CDC B or CDC T+B negative crossmatch). This reached statistical

significance in the CDC T cohort at 1, 3 y 5 years ($p= 0.043$, $p= 0.036$ and $p= 0.005$ respectively).

This same study was repeated analyzing the preformed antibodies by multibead array (Luminex xMAP). The results obtained confirmed the findings seen in the CDC analysis. In all cases the presence of antibodies had a negative impact on the survival of the allograft, reaching statistical significance in the first year for anti-HLA class I antibodies (Luminex I; $p = 0.038$) at 1, 3 and 5 years, and for anti-HLA class II antibodies (Luminex II; $p = 0.0019$, $p=0.03$ and $p=0.038$ respectively). The population that had anti-HLA class I+II antibodies also had a lower survival in comparison to its homologue without antibodies; this was significant at 1 and 3 years (Luminex I+II; $p =0.0018$ and $p= 0.0189$ respectively).

In the second part, we evaluated if there was an association between the presence of preformed anti-HLA class I, class II or class I+II antibodies and a greater incidence of allograft rejection. Similarly to what we had previously done, we analyzed this association in recipients that had a positive crossmatch by CDC or had antibodies detected by Luminex. In the first case we observed that recipients who had anti-HLA class I antibodies (positive crossmatch with CDC T lymphocytes) had a mayor proportion of recipients with global, acute and chronic rejection than those who had a negative crossmatch with CDC T lymphocytes. This difference was statistically significant in all types of allograft rejection. When the study was repeated in CDC B lymphocytes, we also observed an increased number of rejections (global, acute and chronic) in those recipients with anti-HLA class II antibodies in comparison to those without antibodies. However, in this case the differences were not significant in any case. Last, we studied the correlation between preformed anti-HLA class I+II antibodies

(CDC T and B) and rejection we also observed an increased number of recipients with antibodies and allograft rejection. When we repeated the analysis with Luminex we found the same trend, in all cases (Luminex I, II or I+II) recipients with preformed antibodies had more episodes of rejection (global, acute or chronic). The correlation between HLA class II antibodies (Luminex II) and rejection was statistically significant in global rejection ($p=0.002$) and acute rejection ($p=0.01$).

In the third part of the doctoral thesis we evaluated the role of MICA antigens in hepatic transplant. First we analyzed the allelic diversity in a cohort of donor-recipient pairs. Next we evaluated the predominance of MICA alleles in the two cohorts. We found that while MICA*001 was more common in recipients, MICA*002 was more common in donors suggesting that in the first case the allele probably induces susceptibility to hepatic disease or progression towards hepatic failure, whilst in the second it serves a protective function.

Similarly to what we had done with the HLA antigens we evaluated if MICA antigenic compatibility had an impact on allograft survival. Even though this study was performed in a small cohort of patients ($n=33$), our results suggested a tendency towards an increased survival in those recipients with a greater antigenic disparity with their donor (greater number of mismatches) in comparison to more compatible donor-recipient pairs.

Next we analyzed if preformed anti-MICA antibodies played a role in the survival of hepatic allografts or not. In this case we observed that preformed anti-MICA antibodies did not play a relevant role in the survival of the liver allograft. When we studied the correlation between anti-MICA antibodies and allogeneic rejection we did not observe any differences between the groups suggesting that anti-MICA antibodies play

a significant role in hepatic transplant. Last we evaluated the expression of MICA antigen in liver biopsies from living and deceased donors, as well as biopsies obtained at different time points (for example biopsies obtained at time zero (implantation) versus those obtained at the time of the hepatectomy in failed grafts). The degree of MICA expression in living donors was somewhat inferior to that observed in deceased donors which may suggest that in the second group there are mechanisms of cellular stress (for example; death, greater ischemia time) that upregulate the expression of MICA in comparison with the first group. In the second study we compared the expression of MICA in biopsies taken at time zero (implantation) and compared to those obtained at the time of hepatectomy in the case of a failed graft. No differences were observed in the two groups. In order to quantify the degree of MICA expression it would be necessary to perform real time PCR or Western Blot analysis to detect differences between biopsy samples taken at different time intervals.

Conclusions

In conclusion, the most relevant result obtained in this doctoral thesis is that the presence of preformed anti-HLA antibodies plays an important role in the survival and rejection of the hepatic allograft, whereas the presence of anti-MICA antibodies does not seem to play a role in liver allograft outcome. Therefore, the detection of pre-transplant anti-HLA antibodies by complement dependent cytotoxicity (CDC crossmatch) or Luminex cytometry could help stratify patients at risk requiring closer surveillance and tailored immunosuppressive therapy.

Conclusiones

Conclusiones

En conclusión, en esta cohorte de 896 receptores hepáticos encontramos que:

- 1) La compatibilidad HLA global no influye en la supervivencia del aloinjerto hepático.
- 2) La compatibilidad de los antígenos individuales del loci HLA no tienen un impacto sobre la supervivencia del injerto hepático excepto en hepatitis B y retrasplantes, en los que dos mismatches en el locus HLA-A la aumentan de forma estadísticamente significativa a 1, 3 y 5 años.
- 3) Se demuestra una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA y una supervivencia inferior del aloinjerto hepático:
 - a) La supervivencia fue inferior en los receptores con anticuerpos detectados por los tres tipos de prueba cruzada (CDC con linfocitos T, B y T+B). La relación entre la prueba cruzada por CDC con linfocitos T (anticuerpos anti-HLA de clase I), y la menor supervivencia del injerto fue estadísticamente significativa a 1, 3 y 5 años.
 - b) La supervivencia fue inferior en receptores con anticuerpos preformados de clase I, II y I+II detectados por citometría multiparamétrica (Luminex). Esta relación fue estadísticamente significativa en todos los grupos a 1 año. Los anticuerpos de clase II (Luminex II) tuvieron un impacto a lo largo del estudio y la presencia de ambos anticuerpos (clase I+II) a 1 y 3 años respectivamente.

4) Existe una correlación entre la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA y más episodios de rechazos en aloinjertos hepáticos.

a) Los receptores con anticuerpos preformados de clase I (detectados por CDC con linfocitos T), clase II (CDC B) y clase I+II (CDC T+B) tuvieron más episodios de rechazo (global, agudo y crónico) en comparación con sus homólogos sin anticuerpos. Esto fue estadísticamente significativo en CDC T en todos los tipos de rechazo.

b) Los receptores con anticuerpos preformados detectados por citometría multiparamétrica de clase I (Luminex I+), clase II (Luminex II+) y clase I+II (Luminex I+II+) tuvieron más episodios de rechazo (global, agudo y crónico) en comparación con sus homólogos sin anticuerpos. Esto fue estadísticamente significativo en los receptores con anticuerpos de clase II (Luminex II+) asociados con rechazo global y crónico.

5) Existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre los resultados obtenidos para la determinación de anticuerpos anti-HLA por citometría multiparamétrica (Luminex®) y por citotoxicidad mediada por complemento (CDC).

6) El alelo MICA*001 es más frecuente en receptores de trasplante hepático y esto podría sugerir susceptibilidad a enfermedad hepática o a la progresión de la enfermedad hepática a estadios terminales. El alelo MICA*002 es más frecuente en donantes lo que sugiere que es un alelo protector.

7) Los anticuerpos preformados anti-MICA no juegan un papel significativo en la supervivencia o los episodios de rechazo del injerto hepático.

8) La expresión de MICA en hígado procedente de donante vivo es inferior y muestra un patrón granular en la membrana celular en comparación a lo observado en hígado procedente de donante cadáver donde la expresión esta incrementada y muestra un patrón citoplasmático homogéneo.

9) La monitorización de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante hepático, por CDC o por Luminex es de utilidad para estratificar el riesgo del paciente una vez trasplantado y puede ser un parámetro de ayuda en la personalización de su terapia inmunosupresora.

Bibliografía

1. Hooke. La religion de Babilonia y Asiria. AHR E, editor. Barcelona1956. 17-106 p.
2. Sanchez. La literatura del Egipto Antiguo (Breve Antología). Sevilla2003. 257 p.
3. Vazquez CT, L. La anatomía en la Grecia Clásica: el Período Alejandrino Revista del Hospital J.M Ramos Mejia <http://www.ramosmejia.org.ar2006>. vol XI, 1:[
4. Severn CB. A morphological study of the development of the human liver. I. Development of the hepatic diverticulum. The American journal of anatomy. 1971 Jun;131(2):133-58. PubMed PMID: 5575887.
5. Rodes J. Manual de las Enfermedades del hígado y vías biliares. científico_médica, editor. Barcelona; 1982. 433 p.
6. Hígado. Marban_Libros, editor. Madrid2007.
7. Couinaud C. Le Foie: études anatomiques et chirurgicales. Paris1957.
8. Hjortsjo CH. The topography of the intrahepatic duct systems. Acta anatomica. 1951;11(4):599-615. PubMed PMID: 14829155.
9. Fasel JH, Schenk A. Concepts for Liver Segment Classification: Neither Old Ones nor New Ones, but a Comprehensive One. Journal of clinical imaging science. 2013;3:48. PubMed PMID: 24228216. Pubmed Central PMCID: 3823389.
10. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. The Journal of pathology. 2003 Jul;200(4):504-15. PubMed PMID: 12845618.
11. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1995 Nov;9(14):1401-10. PubMed PMID: 7589981.
12. Sherlock. Diseases of the Liver and Biliary system. Oxford: Blackwell publishing; 2002. 681 p.
13. Claria J, Titos E. [Kupffer cell]. Gastroenterologia y hepatologia. 2004 Apr;27(4):264-73. PubMed PMID: 15056414. La celula de Kupffer.
14. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Seminars in liver disease. 2001 Aug;21(3):311-35. PubMed PMID: 11586463.
15. Sarem M, Znaidak R, Macias M, Rey R. [Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions]. Gastroenterologia y hepatologia. 2006 Feb;29(2):93-101. PubMed PMID: 16448612. Las celulas estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas.
16. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. The Journal of clinical investigation. 2013 May 1;123(5):1902-10. PubMed PMID: 23635788. Pubmed Central PMCID: 3635734.
17. Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klaunig JE. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2007 Mar;96(1):2-15. PubMed PMID: 17122412.
18. Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. Journal of immunology. 2005 Dec 1;175(11):7661-8. PubMed PMID: 16301676.
19. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. Comparative hepatology. 2002 Aug 23;1(1):1. PubMed PMID: 12437787. Pubmed Central PMCID: 131011.
20. Gatmaitan Z, Varticovski L, Ling L, Mikkelsen R, Steffan AM, Arias IM. Studies on fenestral contraction in rat liver endothelial cells in culture. The American journal of pathology. 1996 Jun;148(6):2027-41. PubMed PMID: 8669487. Pubmed Central PMCID: 1861643.
21. Oda M, Han JY, Yokomori H. Local regulators of hepatic sinusoidal microcirculation: recent advances. Clinical hemorheology and microcirculation. 2000;23(2-4):85-94. PubMed PMID: 11321464.

-
22. Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, et al. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *The American journal of pathology*. 2003 Oct;163(4):1275-89. PubMed PMID: 14507637. Pubmed Central PMCID: 1868294.
 23. Jacobs F, Wisse E, De Geest B. The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. *The American journal of pathology*. 2010 Jan;176(1):14-21. PubMed PMID: 19948827. Pubmed Central PMCID: 2797863.
 24. El Trasplante Hepático en el comienzo del Milenio. Vicente E, editor. Sao Paulo: Atheneu; ; 2006.
 25. Cicognani C, Malavolti M, Morselli-Labate AM, Zamboni L, Sama C, Barbara L. Serum lipid and lipoprotein patterns in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis. *Archives of internal medicine*. 1997 Apr 14;157(7):792-6. PubMed PMID: 9125012.
 26. Kujovich JL. Hemostatic defects in end stage liver disease. *Critical care clinics*. 2005 Jul;21(3):563-87. PubMed PMID: 15992673.
 27. Walker-Vadillo M. Santos Cosme y Damián. *Revista Digital de Iconografía Medieval [Internet]*. 2011; 111:[51-60 pp.].
 28. Welch C. A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant Bull*. 1955 1955;2:54-5.
 29. Marchioro TL, Porter KA, Dickinson TC, Faris TD, Starzi TE. Physiologic Requirements for Auxiliary Liver Homotransplantation. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1965 Jul;121:17-31. PubMed PMID: 14314095. Pubmed Central PMCID: 2676919.
 30. Cannon J. Brief report. *Transplant Bull*. 1956 1956;3(7).
 31. Starzl T. Reconstructive problems in canine liver homotransplantation with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1960;111::733-43.
 32. Moore FD, Wheele HB, Demissianos HV, Smith LL, Balankura O, Abel K, et al. Experimental whole-organ transplantation of the liver and of the spleen. *Annals of surgery*. 1960 Sep;152:374-87. PubMed PMID: 13772284. Pubmed Central PMCID: 1613660.
 33. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Annals of surgery*. 1989 Nov;210(5):649-52. PubMed PMID: 2818033. Pubmed Central PMCID: 1357802.
 34. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Annals of surgery*. 1968 Sep;168(3):392-415. PubMed PMID: 4877589. Pubmed Central PMCID: 1387344.
 35. Margarit C, Jaurrieta E, Maestre P, Casais L, Oncins J, Fernandez de Sevilla A, et al. [Orthotopic hepatic transplant in a patient with hepatocarcinoma]. *Revista española de las enfermedades del aparato digestivo*. 1984 Sep;66(3):234-9. PubMed PMID: 6093208. Trasplante hepatico ortotopico en un paciente con hepatocarcinoma.
 36. Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72-hour preservation of the canine pancreas. *Transplantation*. 1987 Jan;43(1):5-8. PubMed PMID: 3541322.
 37. Hoffman B, Sollinger H, Kalayoglu M, Belzer FO. Use of UW solution for kidney transplantation. *Transplantation*. 1988 Aug;46(2):338-9. PubMed PMID: 3043790.
 38. Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1989 Feb 3;261(5):711-4. PubMed PMID: 2642982. Pubmed Central PMCID: 2954660.
 39. Vogel T, Brockmann JG, Coussios C, Friend PJ. The role of normothermic extracorporeal perfusion in minimizing ischemia reperfusion injury. *Transplantation reviews*. 2012 Apr;26(2):156-62. PubMed PMID: 22459038.

40. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet*. 1979 Nov 17;2(8151):1033-6. PubMed PMID: 91781.
41. Starzl TE, Weil R, 3rd, Iwatsuki S, Klintmalm G, Schroter GP, Koep LJ, et al. The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1980 Jul;151(1):17-26. PubMed PMID: 6992310. Pubmed Central PMCID: 2727074.
42. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet*. 1989 Oct 28;2(8670):1000-4. PubMed PMID: 2478846. Pubmed Central PMCID: 2966318.
43. Starzl TE, Hakala TR, Shaw BW, Jr., Hardesty RL, Rosenthal TJ, Griffith BP, et al. A flexible procedure for multiple cadaveric organ procurement. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1984 Mar;158(3):223-30. PubMed PMID: 6367113. Pubmed Central PMCID: 2728063.
44. Kang YG, Martin DJ, Marquez J, Lewis JH, Bontempo FA, Shaw BW, Jr., et al. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation. *Anesthesia and analgesia*. 1985 Sep;64(9):888-96. PubMed PMID: 3896028. Pubmed Central PMCID: 2979326.
45. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology*. 1982 Sep-Oct;2(5):614-36. PubMed PMID: 6749635. Pubmed Central PMCID: 2972731.
46. Bismuth H, Houssin D. Reduced-sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *Surgery*. 1984 Mar;95(3):367-70. PubMed PMID: 6367125.
47. Memoria de Actividad. ONT 2012 www.ont.es.
48. Registro Español de Trasplante Hepático Memoria de Resultados 2012 www.sethepatico.org, www.ont.es.
49. ONT. Donación en Asistolia en España: Situación Actual y Recomendaciones. Documento de Consenso Nacional 2012. 2012.
50. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, Perez-Saborido B, Yiliam FS, Calvo AG, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2009 Sep;15(9):1110-8. PubMed PMID: 19718635.
51. Prieto M, Clemente G, Casafont F, Cuende N, Cuervas-Mons V, Figueras J, et al. [Consensus document on indications for liver transplantation. 2002]. *Gastroenterología y hepatología*. 2003 Jun-Jul;26(6):355-75. PubMed PMID: 12809573. Documento de consenso de indicaciones de trasplante hepático.
52. Herrero JI, Sociedad Espanola de Trasplante H. [III Consensus Meeting of the Spanish Society of Liver Transplantation. Hepatitis C, living-donor liver transplantation, quality of liver grafts and of liver transplantation programs]. *Gastroenterología y hepatología*. 2011 Nov;34(9):641-59. PubMed PMID: 22032918. III Reunion de consenso de la Sociedad Espanola de Trasplante Hepatico (SETH). Hepatitis C, trasplante hepatico de donante vivo, calidad de los injertos hepaticos y calidad de los programas de trasplante hepatico.
53. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. Major problems in clinical surgery. 1964;1:1-85. PubMed PMID: 4950264.
54. Pugh RN. Pugh's grading in the classification of liver decompensation. *Gut*. 1992 Nov;33(11):1583. PubMed PMID: 1452091. Pubmed Central PMCID: 1379555.
55. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, et al. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2001 Jul;7(7):567-80. PubMed PMID: 11460223.

-
56. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003 Jan;124(1):91-6. PubMed PMID: 12512033.
57. Kamath PS, Kim WR, Advanced Liver Disease Study G. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007 Mar;45(3):797-805. PubMed PMID: 17326206.
58. Hepatico SEdT. Documento de Consenso de la Sociedad Española de Trasplante Hepático. *Cirugía española*. 2008;83(6):290-300.
59. Feng S. Long-term management of immunosuppression after pediatric liver transplantation: is minimization or withdrawal desirable or possible or both? Current opinion in organ transplantation. 2008 Oct;13(5):506-12. PubMed PMID: 19060534. Pubmed Central PMCID: 2727645.
60. Anglicheau D, Legendre C, Beaune P, Thervet E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics*. 2007 Jul;8(7):835-49. PubMed PMID: 18240909.
61. Heneghan MA, McFarlane IG. Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2002 Jan;35(1):7-13. PubMed PMID: 11786954.
62. Berenguer M. [Immunosuppression and liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection]. *Gastroenterología y hepatología*. 2002 Apr;25(4):276-9. PubMed PMID: 11975881. Inmunosupresion y trasplante hepatico en pacientes infectados por el VHC.
63. Zarrinpar A, Busuttil RW. Immunomodulating options for liver transplant patients. Expert review of clinical immunology. 2012 Aug;8(6):565-78; quiz 78. PubMed PMID: 22992151.
64. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine*. 2004 Dec 23;351(26):2715-29. PubMed PMID: 15616206.
65. Alvarez Lopez M. Inmunología del trasplante hepático. Madrid: Editorial Sintesis; 1997.
66. Schulak J, May E, Post A, Fasola C, Mulligan D, Sterling R. Reduction of early rejection in adult liver transplantation with ATG induction therapy. *Transplantation proceedings*. 1997 Feb-Mar;29(1-2):555-6. PubMed PMID: 9123126.
67. Togashi J, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Yamashiki N, Aoki T, et al. Basiliximab as therapy for acute rejection after liver transplantation for hepatitis C virus cirrhosis. *Bioscience trends*. 2011;5(2):57-60. PubMed PMID: 21572248.
68. Dhesi S, Boland B, Colquhoun S. Alemtuzumab and liver transplantation: a review. Current opinion in organ transplantation. 2009 Jun;14(3):245-9. PubMed PMID: 19417659.
69. Egawa H, Teramukai S, Haga H, Tanabe M, Mori A, Ikegami T, et al. Impact of rituximab desensitization on blood-type-incompatible adult living donor liver transplantation: a Japanese multicenter study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014 Jan;14(1):102-14. PubMed PMID: 24279828.
70. Lucey MR, Terrault N, Ojo L, Hay JE, Neuberger J, Blumberg E, et al. Long-term management of the successful adult liver transplant: 2012 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2013 Jan;19(1):3-26. PubMed PMID: 23281277.
71. Duvoux C, Pageaux GP. Immunosuppression in liver transplant recipients with renal impairment. *Journal of hepatology*. 2011 May;54(5):1041-54. PubMed PMID: 21145927.
72. Soliman T, Hetz H, Burghuber C, Gyori G, Silberhumer G, Steininger R, et al. Short-term induction therapy with anti-thymocyte globulin and delayed use of calcineurin inhibitors in orthotopic liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American*

Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2007 Jul;13(7):1039-44. PubMed PMID: 17600336.

73. Rostaing L, Saliba F, Calmus Y, Dharancy S, Boillot O. Review article: use of induction therapy in liver transplantation. *Transplantation reviews*. 2012 Oct;26(4):246-60. PubMed PMID: 22863028.

74. Ramirez CB, Marino IR. The role of basiliximab induction therapy in organ transplantation. *Expert opinion on biological therapy*. 2007 Jan;7(1):137-48. PubMed PMID: 17150025.

75. Gokmen R, Hernandez-Fuentes MP. Biomarkers of tolerance. *Current opinion in organ transplantation*. 2013 Aug;18(4):416-20. PubMed PMID: 23838646.

76. Alex Bishop G, Bertolino PD, Bowen DG, McCaughan GW. Tolerance in liver transplantation. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2012 Feb;26(1):73-84. PubMed PMID: 22482527.

77. Akbulut S, Yilmaz M, Yilmaz S. Graft-versus-host disease after liver transplantation: a comprehensive literature review. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012 Oct 7;18(37):5240-8. PubMed PMID: 23066319. Pubmed Central PMCID: 3468857.

78. Moser MA, Wall WJ. Management of biliary problems after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2001 Nov;7(11 Suppl 1):S46-52. PubMed PMID: 11689776.

79. McDiarmid SV. Liver transplantation. The pediatric challenge. *Clinics in liver disease*. 2000 Nov;4(4):879-927. PubMed PMID: 11232362.

80. Renz JF, Yersiz H, Reichert PR, Hisatake GM, Farmer DG, Emond JC, et al. Split-liver transplantation: a review. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003 Nov;3(11):1323-35. PubMed PMID: 14525591.

81. Alonso EM, Besedovsky A, Emerick K, Whittington PF. General Criteria for Pediatric Transplantation. In: Klintmalm Ba, editor. *Transplantation of the liver*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

82. Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E, Krantz ID, Spinner NB, Piccoli DA. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):822-9. PubMed PMID: 10051485.

83. Czaja AJ. Autoimmune hepatitis after liver transplantation and other lessons of self-intolerance. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2002 Jun;8(6):505-13. PubMed PMID: 12037780.

84. Gonzalez-Koch A, Czaja AJ, Carpenter HA, Roberts SK, Charlton MR, Porayko MK, et al. Recurrent autoimmune hepatitis after orthotopic liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2001 Apr;7(4):302-10. PubMed PMID: 11303289.

85. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. *Clinics in liver disease*. 2000 Nov;4(4):753-63. PubMed PMID: 11232355.

86. Otte JB, de Ville de Goyet J, de Hemptinne B, Kestens PJ, Moulin D, Carlier MA, et al. Liver transplantation in children: report of 2 1/2 years' experience at the University of Louvain Medical School in Brussels. *Transplantation proceedings*. 1987 Aug;19(4):3289-302. PubMed PMID: 3303495.

87. McDiarmid SV, Anand R, Lindblad AS, Principal I, Institutions of the Studies of Pediatric Liver Transplantation Research G. Development of a pediatric end-stage liver disease score to predict poor outcome in children awaiting liver transplantation. *Transplantation*. 2002 Jul 27;74(2):173-81. PubMed PMID: 12151728.

-
88. Freeman RB, Jr., Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, et al. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2002 Sep;8(9):851-8. PubMed PMID: 12200791.
89. Lakkis FG, Lechler RI. Origin and biology of the allogeneic response. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013 Aug;3(8). PubMed PMID: 23906882.
90. Franco A, Castañer J, CBootello A. Bases moleculares del reconocimiento alogénico. *Clínicas Urológicas de la Complutense*. 1999:31-59.
91. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2001 Jul;1(2):97-102. PubMed PMID: 12099369.
92. Hornick P. Direct and indirect allorecognition. *Methods in molecular biology*. 2006;333:145-56. PubMed PMID: 16790850.
93. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Oct;106(8):1003-10. PubMed PMID: 11032860. Pubmed Central PMCID: 314344.
94. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Lechler RI. The role of the allograft in the induction of donor-specific T cell hyporesponsiveness. *Transplantation*. 2001 Aug 15;72(3):480-5. PubMed PMID: 11502979.
95. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 1982 Jan 1;155(1):31-41. PubMed PMID: 7033437. Pubmed Central PMCID: 2186574.
96. Auchincloss H, Jr., Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Apr 15;90(8):3373-7. PubMed PMID: 8475083. Pubmed Central PMCID: 46302.
97. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *Journal of immunology*. 2004 Oct 15;173(8):4828-37. PubMed PMID: 15470023.
98. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):86-9. PubMed PMID: 9510252.
99. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *Journal of immunology*. 2001 Mar 15;166(6):3717-23. PubMed PMID: 11238612.
100. Russo V, Zhou D, Sartirana C, Rovere P, Villa A, Rossini S, et al. Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3473-7. PubMed PMID: 10828031.
101. Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. *Comprehensive Physiology*. 2013 Apr;3(2):567-98. PubMed PMID: 23720323.
102. Selmi C, Mackay IR, Gershwin ME. The immunological milieu of the liver. *Seminars in liver disease*. 2007 May;27(2):129-39. PubMed PMID: 17520513.
103. Renna-Molajoni E, Cinti P, Elia L, Orlandini AM, Cocciolo P, Molajoni J, et al. Mechanism of liver allograft rejection: indirect allorecognition. *Transplantation proceedings*. 1999 Feb-Mar;31(1-2):409-10. PubMed PMID: 10083165.

-
104. Toyokawa H, Nakao A, Bailey RJ, Nalesnik MA, Kaizu T, Lemoine JL, et al. Relative contribution of direct and indirect allorecognition in developing tolerance after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2008 Mar;14(3):346-57. PubMed PMID: 18306376. Pubmed Central PMCID: 3022430.
105. Markus BH, Duquesnoy RJ, Gordon RD, Fung JJ, Vanek M, Klintmalm G, et al. Histocompatibility and liver transplant outcome. Does HLA exert a dualistic effect? *Transplantation*. 1988 Sep;46(3):372-7. PubMed PMID: 3047927. Pubmed Central PMCID: 2956422.
106. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciu-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *International immunology*. 1998 Jun;10(6):775-83. PubMed PMID: 9678758.
107. Hubscher SG. Antibody-mediated rejection in the liver allograft. *Current opinion in organ transplantation*. 2012 Jun;17(3):280-6. PubMed PMID: 22569512.
108. O'Leary JG, Klintmalm GB. Impact of donor-specific antibodies on results of liver transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2013 Jun;18(3):279-84. PubMed PMID: 23591739.
109. Thurairajah PH, Carbone M, Bridgestock H, Thomas P, Hebbar S, Gunson BK, et al. Late acute liver allograft rejection; a study of its natural history and graft survival in the current era. *Transplantation*. 2013 Apr 15;95(7):955-9. PubMed PMID: 23442806.
110. Platt JL. Antibodies in transplantation. *Discovery medicine*. 2010 Aug;10(51):125-33. PubMed PMID: 20807473. Pubmed Central PMCID: 3056494.
111. Janeway CJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science; 2001.
112. Regueiro J. *Inmunología-Biología y patología del sistema inmunitario*. Madrid: Panamericana; 2010. 29-37 p.
113. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *The New England journal of medicine*. 2013 Sep 26;369(13):1215-26. PubMed PMID: 24066742.
114. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American journal of pathology*. 2003 Feb;162(2):363-7. PubMed PMID: 12547694. Pubmed Central PMCID: 1851148.
115. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *The American journal of physiology*. 1993 Apr;264(4 Pt 1):G801-9. PubMed PMID: 8476062.
116. Chang AT, Platt JL. The role of antibodies in transplantation. *Transplantation reviews*. 2009 Oct;23(4):191-8. PubMed PMID: 19628382. Pubmed Central PMCID: 2752491.
117. Salama AD, Delikouras A, Pusey CD, Cook HT, Bhargal G, Lechler RI, et al. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2001 Sep;1(3):260-9. PubMed PMID: 12102260.
118. Alexandre GP, De Bruyere M, Squifflet JP, Moriau M, Latinne D, Pirson Y. Human ABO-incompatible living donor renal homografts. *The Netherlands journal of medicine*. 1985;28(6):231-4. PubMed PMID: 3892322.
119. Palmer A, Taube D, Welsh K, Bewick M, Gjorstrup P, Thick M. Removal of anti-HLA antibodies by extracorporeal immunoadsorption to enable renal transplantation. *Lancet*. 1989 Jan 7;1(8628):10-2. PubMed PMID: 2563001.
120. Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, Mark W, Koyamada N, Miyatake T, et al. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor

endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nature medicine*. 1997 Feb;3(2):196-204. PubMed PMID: 9018239.

121. Mohiuddin MM, Ogawa H, Yin DP, Shen J, Galili U. Antibody-mediated accommodation of heart grafts expressing an incompatible carbohydrate antigen. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):258-62. PubMed PMID: 12589143.

122. Castillo-Rama M, Sebah M, Sasatomi E, Randhawa P, Isse K, Salgarkar AD, et al. "Plasma Cell Hepatitis" in Liver Allografts: Identification and Characterization of an IgG4-Rich Cohort. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013 Nov;13(11):2966-77. PubMed PMID: 24011021.

123. Ulfvin A, Backer AE, Clausen H, Hakomori S, Rydberg L, Samuelsson BE, et al. Expression of glycolipid blood group antigens in single human kidneys: change in antigen expression of rejected ABO incompatible kidney grafts. *Kidney international*. 1993 Dec;44(6):1289-97. PubMed PMID: 7508004.

124. Zhang J, Hu W, Xing W, You T, Xu J, Qin X, et al. The protective role of CD59 and pathogenic role of complement in hepatic ischemia and reperfusion injury. *The American journal of pathology*. 2011 Dec;179(6):2876-84. PubMed PMID: 22019898. Pubmed Central PMCID: 3260856.

125. Shin ML, Hansch G, Mayer MM. Effect of agents that produce membrane disorder on lysis of erythrocytes by complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981 Apr;78(4):2522-5. PubMed PMID: 6941304. Pubmed Central PMCID: 319379.

126. Carney DF, Koski CL, Shin ML. Elimination of terminal complement intermediates from the plasma membrane of nucleated cells: the rate of disappearance differs for cells carrying C5b-7 or C5b-8 or a mixture of C5b-8 with a limited number of C5b-9. *Journal of immunology*. 1985 Mar;134(3):1804-9. PubMed PMID: 3968432.

127. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology*. 1997 Mar;25(3):658-63. PubMed PMID: 9049215.

128. Banff Working Group on Liver Allograft P. Importance of liver biopsy findings in immunosuppression management: biopsy monitoring and working criteria for patients with operational tolerance. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2012 Oct;18(10):1154-70. PubMed PMID: 22645090.

129. Banff Working G, Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, et al. Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology*. 2006 Aug;44(2):489-501. PubMed PMID: 16871565.

130. Freese DK, Snover DC, Sharp HL, Gross CR, Savick SK, Payne WD. Chronic rejection after liver transplantation: a study of clinical, histopathological and immunological features. *Hepatology*. 1991 May;13(5):882-91. PubMed PMID: 2029992.

131. AR. Limaye. Liver Biopsy After Liver Transplantation, Liver Biopsy - Indications, Procedures, Results,. 2012. <http://www.intechopen.com/books/liver-biopsy-indications-procedures-results/liver-biopsy-after-liver-transplantation>.

132. Bodmer WF. The HLA system: structure and function. *Journal of clinical pathology*. 1987 Sep;40(9):948-58. PubMed PMID: 3312304. Pubmed Central PMCID: 1141164.

133. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000 Sep 7;343(10):702-9. PubMed PMID: 10974135.

134. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;14:301-23. PubMed PMID: 23875801.

-
135. Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013 Oct 15;19(20):5564-71. PubMed PMID: 23897901.
136. Moscoso J, Serrano-Vela JI, Arnaiz-Villena A. MHC-F polymorphism and evolution. *Tissue antigens*. 2007 Apr;69 Suppl 1:136-9. PubMed PMID: 17445188.
137. Wake CT. Molecular biology of the HLA class I and class II genes. *Molecular biology & medicine*. 1986 Feb;3(1):1-11. PubMed PMID: 3083191.
138. Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature reviews Immunology*. 2009 Jul;9(7):503-13. PubMed PMID: 19498380.
139. Williams A, Peh CA, Elliott T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue antigens*. 2002 Jan;59(1):3-17. PubMed PMID: 11972873.
140. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *Journal of clinical pathology*. 2010 May;63(5):387-90. PubMed PMID: 20418230.
141. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology*. 2011 Dec;11(12):823-36. PubMed PMID: 22076556.
142. Choy MK, Phipps ME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends in molecular medicine*. 2010 Mar;16(3):97-106. PubMed PMID: 20153697.
143. Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity*. 1999 May;10(5):577-84. PubMed PMID: 10367903.
144. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Jul 5;91(14):6259-63. PubMed PMID: 8022771. Pubmed Central PMCID: 44180.
145. Lucas D, Campillo JA, Lopez-Hernandez R, Martinez-Garcia P, Lopez-Sanchez M, Botella C, et al. Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Human immunology*. 2008 Oct;69(10):655-60. PubMed PMID: 18718856.
146. Spies T. Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair. *Nature immunology*. 2008 Sep;9(9):1013-5. PubMed PMID: 18711442.
147. Lanier LL. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunological reviews*. 2009 Jan;227(1):150-60. PubMed PMID: 19120482. Pubmed Central PMCID: 2794881.
148. Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Gonzalez MZ, Fdez-Morera JL, Diaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, et al. The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007 Jul;7(7):1842-8. PubMed PMID: 17511763.
149. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A, Zhang Y, Lavingia B, Stastny P. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Human immunology*. 2002 Jan;63(1):30-9. PubMed PMID: 11916168.
150. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation*. 2002 Jul 27;74(2):268-77. PubMed PMID: 12151741.
151. Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *The New England journal of medicine*. 2007 Sep 27;357(13):1293-300. PubMed PMID: 17898098.

152. Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends in immunology*. 2001 Jul;22(7):378-85. PubMed PMID: 11429322.
153. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Oct 29;93(22):12445-50. PubMed PMID: 8901601. Pubmed Central PMCID: 38011.
154. Hue S, Monteiro RC, Berrih-Aknin S, Caillat-Zucman S. Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells. *Journal of immunology*. 2003 Aug 15;171(4):1909-17. PubMed PMID: 12902493.
155. Elsner L, Flugge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY, et al. The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010 Apr;14(4):992-1002. PubMed PMID: 20569278.
156. Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochimica et biophysica acta*. 2001 Apr 3;1526(1):10-2. PubMed PMID: 11287116.
157. Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends in immunology*. 2003 Feb;24(2):82-7. PubMed PMID: 12547505.
158. Hankey KG, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Klassen DK, Philosophe B, Bartlett ST, et al. MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation*. 2002 Jan 27;73(2):304-6. PubMed PMID: 11821751.
159. Lerner S CPyMP. *Chronic Allograft Failure: Natural History, Pathogenesis, Diagnosis and Management*. Austin, Texas: Landes Bioscience; 2008.
160. Vierling JM, Fennell RH, Jr. Histopathology of early and late human hepatic allograft rejection: evidence of progressive destruction of interlobular bile ducts. *Hepatology*. 1985 Nov-Dec;5(6):1076-82. PubMed PMID: 3905558.
161. Demetris A, Adams D, Bellamy C, Blakolmer K, Clouston A, Dhillon AP, et al. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology*. 2000 Mar;31(3):792-9. PubMed PMID: 10706577.
162. Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Diaz-Molina B, Bernardo-Rodriguez MJ, Alvarez-Lopez R, Pascual D, et al. The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft rejection. *Transplantation*. 2006 Aug 15;82(3):354-61. PubMed PMID: 16906033.
163. Fuggle SV, Martin S. Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation*. 2008 Aug 15;86(3):384-90. PubMed PMID: 18698240.
164. Junqueira LC. *Histología Básica*. Mexico: Editorial Salvat; 1988.
165. Ross M. *Histología, texto y atlas color: LTC*; 1992 1992. 40-9 p.
166. Gartner L. *Histología, texto y atlas*. Hill EM, editor. Mexico 2001. 1-3 p.
167. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, et al. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009 Jun 1;199(11):1707-15. PubMed PMID: 19405864.
168. D. C. *Modelling survival data in medical research*. London: Chapman and Hall; 1994.
169. Fernandez P. *Análisis de supervivencia*. *Cadernos de Atención Primaria* 1995.
170. Takemoto S, Port FK, Claas FH, Duquesnoy RJ. HLA matching for kidney transplantation. *Human immunology*. 2004 Dec;65(12):1489-505. PubMed PMID: 15603878.
171. Takemoto S, Terasaki PI, Cecka JM, Cho YW, Gjertson DW. Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors. *The UNOS Scientific Renal*

- Transplant Registry. The New England journal of medicine. 1992 Sep 17;327(12):834-9. PubMed PMID: 1508242.
172. Taylor CJ, Smith SI, Sharples LD, Parameshwar J, Cary NR, Keogan M, et al. Human leukocyte antigen compatibility in heart transplantation: evidence for a differential role of HLA matching on short- and medium-term patient survival. *Transplantation*. 1997 May 15;63(9):1346-51. PubMed PMID: 9158031.
173. Opelz G, Wujciak T. The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. The Collaborative Transplant Study. *The New England journal of medicine*. 1994 Mar 24;330(12):816-9. PubMed PMID: 8068075.
174. Kaczmarek I, Deutsch MA, Rohrer ME, Beiras-Fernandez A, Groetzner J, Daebritz S, et al. HLA-DR matching improves survival after heart transplantation: is it time to change allocation policies? *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2006 Sep;25(9):1057-62. PubMed PMID: 16962466.
175. Lan X, Zhang MM, Pu CL, Guo CB, Kang Q, Li YC, et al. Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of liver transplantation: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010 Jul 21;16(27):3457-64. PubMed PMID: 20632452. Pubmed Central PMCID: 2904896.
176. Nikaein A, Backman L, Jennings L, Levy MF, Goldstein R, Gonwa T, et al. HLA compatibility and liver transplant outcome. Improved patient survival by HLA and cross-matching. *Transplantation*. 1994 Oct 15;58(7):786-92. PubMed PMID: 7940711.
177. Uchiyama H, Kayashima H, Matono R, Shirabe K, Yoshizumi T, Ikegami T, et al. Relevance of HLA compatibility in living donor liver transplantation: the double-edged sword associated with the patient outcome. *Clinical transplantation*. 2012 Sep-Oct;26(5):E522-9. PubMed PMID: 23061761.
178. Knechtle SJ, Kalayolu M, D'Alessandro AM, Mason B, Pirsch JD, Sollinger HW, et al. Histocompatibility and liver transplantation. *Surgery*. 1993 Oct;114(4):667-71; discussion 71-2. PubMed PMID: 8211680.
179. Lobo PI, Spencer C, Douglas MT, Stevenson WC, Pruett TL. The lack of long-term detrimental effects on liver allografts caused by donor-specific anti-HLA antibodies. *Transplantation*. 1993 May;55(5):1063-6. PubMed PMID: 8497883.
180. Donaldson PT, Thomson LJ, Heads A, Underhill JA, Vaughan RW, Rolando N, et al. IgG donor-specific crossmatches are not associated with graft rejection or poor graft survival after liver transplantation. An assessment by cytotoxicity and flow cytometry. *Transplantation*. 1995 Nov 15;60(9):1016-23. PubMed PMID: 7491675.
181. Jakab SS, Navarro VJ, Colombe BW, Daskalakis C, Herrine SK, Rossi S. Human leukocyte antigen and adult living-donor liver transplantation outcomes: an analysis of the organ procurement and transplantation network database. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2007 Oct;13(10):1405-13. PubMed PMID: 17902126.
182. Zinkernagel RM, Doherty PC. Cytotoxic thymus-derived lymphocytes in cerebrospinal fluid of mice with lymphocytic choriomeningitis. *The Journal of experimental medicine*. 1973 Nov 1;138(5):1266-9. PubMed PMID: 4542807. Pubmed Central PMCID: 2139441.
183. Manez R, White LT, Linden P, Kusne S, Martin M, Kramer D, et al. The influence of HLA matching on cytomegalovirus hepatitis and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation*. 1993 May;55(5):1067-71. PubMed PMID: 8388584. Pubmed Central PMCID: 3091368.
184. Manez R, Mateo R, Tabasco J, Kusne S, Starzl TE, Duquesnoy RJ. The influence of HLA donor-recipient compatibility on the recurrence of HBV and HCV hepatitis after liver

transplantation. *Transplantation*. 1995 Feb 27;59(4):640-2. PubMed PMID: 7878772. Pubmed Central PMCID: 2993506.

185. Manez R, Bronsther O, Kusne S, Llull R, Aguado JM, Starzl TE. Vanishing bile duct syndrome after liver transplantation: alloreactivity or viral reactivity? *Transplantation proceedings*. 1995 Aug;27(4):2280. PubMed PMID: 7652805.

186. Li XC, Kloc M, Ghobrial RM. Memory T cells in transplantation - progress and challenges. *Current opinion in organ transplantation*. 2013 Aug;18(4):387-92. PubMed PMID: 23838642.

187. Bingaman AW, Farber DL. Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004 Jun;4(6):846-52. PubMed PMID: 15147417.

188. Navarro V, Herrine S, Katopes C, Colombe B, Spain CV. The effect of HLA class I (A and B) and class II (DR) compatibility on liver transplantation outcomes: an analysis of the OPTN database. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006 Apr;12(4):652-8. PubMed PMID: 16555339.

189. Neumann UP, Langrehr JM, Lang M, Schmitz V, Menzel S, Steinmueller T, et al. Impact of HLA matching upon outcome after liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2002 Aug;34(5):1499-500. PubMed PMID: 12176456.

190. Francavilla R, Hadzic N, Underhill J, Heaton N, Rela M, Mieli-Vergani G, et al. Role of HLA compatibility in pediatric liver transplantation. *Transplantation*. 1998 Jul 15;66(1):53-8. PubMed PMID: 9679822.

191. Kasahara M, Kiuchi T, Uryuhara K, Uemoto S, Fujimoto Y, Ogura Y, et al. Role of HLA compatibility in pediatric living-related liver transplantation. *Transplantation*. 2002 Oct 27;74(8):1175-80. PubMed PMID: 12438966.

192. Muro M, Lopez-Alvarez MR, Campillo JA, Marin L, Moya-Quiles MR, Bolarin JM, et al. Influence of human leukocyte antigen mismatching on rejection development and allograft survival in liver transplantation: is the relevance of HLA-A locus matching being underestimated? *Transplant immunology*. 2012 Mar;26(2-3):88-93. PubMed PMID: 22129495.

193. Neumann UP, Langrehr JM, Naumann U, Lang M, Rayes N, Steinmuller T, et al. Impact of HLA-compatibilities in patients undergoing liver transplantation for HBV-cirrhosis. *Clinical transplantation*. 2002 Apr;16(2):122-9. PubMed PMID: 11966782.

194. Belli LS, Zavaglia C, Alberti AB, Poli F, Rondinara G, Silini E, et al. Influence of immunogenetic background on the outcome of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology*. 2000 Jun;31(6):1345-50. PubMed PMID: 10827162.

195. Belli LS, Burra P, Poli F, Battista Alberti A, Silini E, Zavaglia C, et al. HLA-DRB1 donor-recipient mismatch affects the outcome of hepatitis C disease recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2006 Mar;130(3):695-702. PubMed PMID: 16530511.

196. Calmus Y, Hannoun L, Dousset B, Wolff P, Miguët JP, Doffoel M, et al. HLA class I matching is responsible for the hepatic lesions in recurrent viral hepatitis B after liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1990 Oct;22(5):2311-3. PubMed PMID: 2219384.

197. Los-Rycharska E, Szaflarska-Poplawska A. Influence of selected HLA tissue compatibility antigens on the course and efficacy of viral hepatitis C treatment--actual knowledge position. *Advances in medical sciences*. 2009;54(1):14-9. PubMed PMID: 19482730.

198. Romero-Gomez M, Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Barroso N, Montes-Cano MA, Sanchez-Munoz D, et al. HLA class I B44 is associated with sustained response to interferon + ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *The American journal of gastroenterology*. 2003 Jul;98(7):1621-6. PubMed PMID: 12873589.

199. Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, Moss B, Pinkert CA, Palmiter RD, et al. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science*. 1990 Apr 20;248(4953):361-4. PubMed PMID: 1691527.
200. Garcia-Buey L, Lopez-Botet M, Garcia-Sanchez A, Balboa MA, Aramburu J, Garcia-Monzon C, et al. Variability in the expression of a beta 2-microglobulin epitope on hepatocytes in chronic type C hepatitis on treatment with interferon. *Hepatology*. 1993 Mar;17(3):372-82. PubMed PMID: 7680330.
201. Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, Demetris AJ, Flynn B, Irish W, et al. Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1997 Jan 27;63(2):243-9. PubMed PMID: 9020325. Pubmed Central PMCID: 3005336.
202. Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology*. 1998 Apr;27(4):926-33. PubMed PMID: 9537430.
203. Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunological tolerance and liver transplantation. *Journal of hepatology*. 2004 Nov;41(5):698-705. PubMed PMID: 15519640.
204. Ohe H, Waki K, Yoshitomi M, Morimoto T, Nafady-Hego H, Satoda N, et al. Factors affecting operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation: impact of early post-transplant events and HLA match. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2012 Jan;25(1):97-106. PubMed PMID: 22117557.
205. Donaldson PT, Williams R. Cross-matching in liver transplantation. *Transplantation*. 1997 Mar 27;63(6):789-94. PubMed PMID: 9089216.
206. Ruiz R, Tomiyama K, Campsen J, Goldstein RM, Levy MF, McKenna GJ, et al. Implications of a positive crossmatch in liver transplantation: a 20-year review. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2012 Apr;18(4):455-60. PubMed PMID: 22139972.
207. Charco R, Vargas V, Balsells J, Lazaro JL, Murio E, Jaurieta E, et al. Influence of anti-HLA antibodies and positive T-lymphocytotoxic crossmatch on survival and graft rejection in human liver transplantation. *Journal of hepatology*. 1996 Apr;24(4):452-9. PubMed PMID: 8738732.
208. Doyle HR, Marino IR, Morelli F, Doria C, Aldrighetti L, McMichael J, et al. Assessing risk in liver transplantation. Special reference to the significance of a positive cytotoxic crossmatch. *Annals of surgery*. 1996 Aug;224(2):168-77. PubMed PMID: 8757380. Pubmed Central PMCID: 1235338.
209. Neumann UP, Lang M, Moldenhauer A, Langrehr JM, Glanemann M, Kahl A, et al. Significance of a T-lymphocytotoxic crossmatch in liver and combined liver-kidney transplantation. *Transplantation*. 2001 Apr 27;71(8):1163-8. PubMed PMID: 11374419.
210. Gordon RD, Fung JJ, Iwatsuki S, Duquesnoy RJ, Starzl TE. Immunological factors influencing liver graft survival. *Gastroenterology clinics of North America*. 1988 Mar;17(1):53-9. PubMed PMID: 3292431.
211. Gordon RD, Fung JJ, Markus B, Fox I, Iwatsuki S, Esquivel CO, et al. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery*. 1986 Oct;100(4):705-15. PubMed PMID: 3532391. Pubmed Central PMCID: 3095820.
212. Mosconi G, Scolari MP, Feliciangeli G, Zanetti A, Zanelli P, Buscaroli A, et al. Combined liver-kidney transplantation with preformed anti-HLA antibodies: a case report. *Transplantation proceedings*. 2006 May;38(4):1125-6. PubMed PMID: 16757284.
213. Olausson M, Mjornstedt L, Norden G, Rydberg L, Molne J, Backman L, et al. Successful combined partial auxiliary liver and kidney transplantation in highly sensitized cross-match positive recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007 Jan;7(1):130-6. PubMed PMID: 17227562.

214. Eid A, Moore SB, Wiesner RH, DeGoey SR, Nielson A, Krom RA. Evidence that the liver does not always protect the kidney from hyperacute rejection in combined liver-kidney transplantation across a positive lymphocyte crossmatch. *Transplantation*. 1990 Aug;50(2):331-4. PubMed PMID: 2382298.
215. Saidman SL, Duquesnoy RJ, Demetris AJ, McCauley J, Ramos H, Mazariegos G, et al. Combined liver-kidney transplantation and the effect of preformed lymphocytotoxic antibodies. *Transplant immunology*. 1994;2(1):61-7. PubMed PMID: 8081794. Pubmed Central PMCID: 2956073.
216. Watson R, Kozlowski T, Nickeleit V, Woosley JT, Schmitz JL, Zacks SL, et al. Isolated donor specific alloantibody-mediated rejection after ABO compatible liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006 Dec;6(12):3022-9. PubMed PMID: 17061997.
217. Doran TJ, Geczy AF, Painter D, McCaughan G, Sheil AG, Susal C, et al. A large, single center investigation of the immunogenetic factors affecting liver transplantation. *Transplantation*. 2000 Apr 15;69(7):1491-8. PubMed PMID: 10798776.
218. Hathaway M, Gunson BK, Keogh AC, Briggs D, McMaster P, Neuberger JM. A positive crossmatch in liver transplantation--no effect or inappropriate analysis? A prospective study. *Transplantation*. 1997 Jul 15;64(1):54-9. PubMed PMID: 9233701.
219. Takaya S, Jain A, Yagihashi A, Nakamura K, Kobayashi M, Takeuchi K, et al. Increased bile duct complications and/or chronic rejection in crossmatch positive human liver allografts. *Transplantation proceedings*. 1999 Aug;31(5):2028-31. PubMed PMID: 10455963. Pubmed Central PMCID: 2980294.
220. Bishara A, Brautbar C, Eid A, Scherman L, Ilan Y, Safadi R. Is presensitization relevant to liver transplantation outcome? *Human immunology*. 2002 Sep;63(9):742-50. PubMed PMID: 12175728.
221. Muro M, Marin L, Miras M, Moya-Quiles R, Minguela A, Sanchez-Bueno F, et al. Liver recipients harbouring anti-donor preformed lymphocytotoxic antibodies exhibit a poor allograft survival at the first year after transplantation: experience of one centre. *Transplant immunology*. 2005 Jun;14(2):91-7. PubMed PMID: 15935299.
222. Cervelli C, Pisani F, Aureli A, Azzarone R, Scimitarra M, Battistoni C, et al. For anti-HLA-specific donor antibodies detection by flow cytometry cytotoxic crossmatches comparison of methods. *Transplantation proceedings*. 2013 Sep;45(7):2761-4. PubMed PMID: 24034042.
223. Charco R, Balsells J, Murio E, Lazaro JL, Margarit C, Martorell J. Adverse impact of high panel-reactive antibody (PRA) and positive cytotoxic crossmatch in liver transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1994;7 Suppl 1:S94-6. PubMed PMID: 11271345.
224. Buelow R, Chiang TR, Monteiro F, Cornejo MC, Ellingson L, Claas F, et al. Soluble HLA antigens and ELISA--a new technology for crossmatch testing. *Transplantation*. 1995 Dec 27;60(12):1594-9. PubMed PMID: 8545896.
225. Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013 Jan 15;95(1):19-47. PubMed PMID: 23238534.
226. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Human immunology*. 1999 Dec;60(12):1293-302. PubMed PMID: 10626745.
227. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation*. 2003 Jan 15;75(1):43-9. PubMed PMID: 12544869.

228. Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection: technology emulating biology. *Immunologic research*. 2004;29(1-3):41-54. PubMed PMID: 15181269.
229. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen JC, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012 Feb;12(2):313-21. PubMed PMID: 22070565. Pubmed Central PMCID: 3667648.
230. Taner T, Gandhi MJ, Sanderson SO, Poterucha CR, De Goey SR, Stegall MD, et al. Prevalence, course and impact of HLA donor-specific antibodies in liver transplantation in the first year. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012 Jun;12(6):1504-10. PubMed PMID: 22420671.
231. Perera M, Silva M, Murphy N, Briggs D, Mirza D, Neil D. Influence of preformed donor-specific antibodies and C4d on early liver allograft function. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2013 Dec;48(12):1444-51. PubMed PMID: 24131305.
232. Kamar N, Lavayssiere L, Muscari F, Selves J, Guilbeau-Frugier C, Cardeau I, et al. Early plasmapheresis and rituximab for acute humoral rejection after ABO-compatible liver transplantation. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009 Jul 21;15(27):3426-30. PubMed PMID: 19610146. Pubmed Central PMCID: 2712906.
233. Musat AI, Agni RM, Wai PY, Pirsch JD, Lorentzen DF, Powell A, et al. The significance of donor-specific HLA antibodies in rejection and ductopenia development in ABO compatible liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011 Mar;11(3):500-10. PubMed PMID: 21342448. Pubmed Central PMCID: 3357120.
234. O'Leary JG, Kaneku H, Susskind BM, Jennings LW, Neri MA, Davis GL, et al. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011 Sep;11(9):1868-76. PubMed PMID: 21672151.
235. Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, et al. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013 Jun;13(6):1541-8. PubMed PMID: 23721554.
236. Musat AI, Pigott CM, Ellis TM, Agni RM, Levenson GE, Powell AJ, et al. Pretransplant donor-specific anti-HLA antibodies as predictors of early allograft rejection in ABO-compatible liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2013 Oct;19(10):1132-41. PubMed PMID: 23873778.
237. O'Leary JG, Kaneku H, Demetris AJ, Marr JD, Shiller SM, Susskind BM, et al. Antibody-mediated rejection as a contributor to previously unexplained early liver allograft loss. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2013 Nov 6. PubMed PMID: 24382837.
238. O'Leary JG, Gebel HM, Ruiz R, Bray RA, Marr JD, Zhou XJ, et al. Class II alloantibody and mortality in simultaneous liver-kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013 Apr;13(4):954-60. PubMed PMID: 23433356.

239. Horne PH, Lunsford KE, Eiring AM, Wang Y, Gao D, Bumgardner GL. CD4+ T-cell-dependent immune damage of liver parenchymal cells is mediated by alloantibody. *Transplantation*. 2005 Aug 27;80(4):514-21. PubMed PMID: 16123727.
240. Howell WM, Harmer A, Briggs D, Dyer P, Fuggle SV, Martin S, et al. British Society for Histocompatibility & Immunogenetics and British Transplantation Society guidelines for the detection and characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation. *International journal of immunogenetics*. 2010 Dec;37(6):435-7. PubMed PMID: 20670336.
241. Kozlowski T, Rubinas T, Nickeleit V, Woosley J, Schmitz J, Collins D, et al. Liver allograft antibody-mediated rejection with demonstration of sinusoidal C4d staining and circulating donor-specific antibodies. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011 Apr;17(4):357-68. PubMed PMID: 21445918.
242. Miyagawa-Hayashino A, Yoshizawa A, Uchida Y, Egawa H, Yurugi K, Masuda S, et al. Progressive graft fibrosis and donor-specific human leukocyte antigen antibodies in pediatric late liver allografts. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2012 Nov;18(11):1333-42. PubMed PMID: 22888064.
243. Girnita A, Mazariegos GV, Castellaneta A, Reyes J, Bentelejewski C, Thomson AW, et al. Liver transplant recipients weaned off immunosuppression lack circulating donor-specific antibodies. *Human immunology*. 2010 Mar;71(3):274-6. PubMed PMID: 20006667.
244. Waki K, Sugawara Y, Mizuta K, Taniguchi M, Ozawa M, Hirata M, et al. Predicting operational tolerance in pediatric living-donor liver transplantation by absence of HLA antibodies. *Transplantation*. 2013 Jan 15;95(1):177-83. PubMed PMID: 23232368.
245. Aguilera I, Wichmann I, Gentil MA, Gonzalez-Escribano F, Nunez-Roldan A. Alloimmune response against donor glutathione S-transferase T1 antigen in renal transplant recipients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2005 Aug;46(2):345-50. PubMed PMID: 16112055.
246. Win TS, Pettigrew GJ. Humoral autoimmunity and transplant vasculopathy: when allo is not enough. *Transplantation*. 2010 Jul 27;90(2):113-20. PubMed PMID: 20531074.
247. Kamei H, Masuda S, Nakamura T, Fujimoto Y, Oike F, Ogura Y, et al. Impact of glutathione S-transferase T1 gene polymorphisms on acute cellular rejection in living donor liver transplantation. *Transplant immunology*. 2013 Jan;28(1):14-7. PubMed PMID: 23153768.
248. Munoz-Saa I, Cambra A, Pallares L, Espinosa G, Juan A, Pujalte F, et al. Allelic diversity and affinity variants of MICA are imbalanced in Spanish patients with Behcet's disease. *Scandinavian journal of immunology*. 2006 Jul;64(1):77-82. PubMed PMID: 16784494.
249. Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*. 2011 May;43(5):455-8. PubMed PMID: 21499248.
250. Tong HV, Toan NL, Song LH, Bock CT, Kremsner PG, Velavan TP. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: functional roles of MICA variants. *Journal of viral hepatitis*. 2013 Oct;20(10):687-98. PubMed PMID: 24010643.
251. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. 2001 May-Jun;53(4):279-87. PubMed PMID: 11491531.
252. Choy MK, Phipps ME. Possible polyphyletic origin of major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) alleles. *Journal of molecular evolution*. 2003 Jul;57(1):38-43. PubMed PMID: 12962304.
253. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America. 1997 Feb 18;94(4):1298-303. PubMed PMID: 9037047. Pubmed Central PMCID: 19785.
254. Ciszek M, Foronczewicz B, Mucha K, Zochowska D, Ziarkiewicz-Wroblewska B, Krawczyk M, et al. Anti-HLA and Anti-MICA Antibodies in Liver Transplant Recipients: Effect on Long-Term Graft Survival. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013;2013:5.
255. Sanchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Castillo-Rama M, Morales P, Lora-Pablos D, Valero-Hervas D, et al. Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period. *Transplantation*. 2013 Jul 15;96(1):70-8. PubMed PMID: 23624543.
256. Mizutani K, Terasaki P, Bignon JD, Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Shih RN, et al. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Human immunology*. 2006 Sep;67(9):683-91. PubMed PMID: 17002898.
257. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Human immunology*. 2006 Mar;67(3):230-7. PubMed PMID: 16698447.
258. Kauke T, Kaczmarek I, Dick A, Schmoeckel M, Deutsch MA, Beiras-Fernandez A, et al. Anti-MICA antibodies are related to adverse outcome in heart transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2009 Apr;28(4):305-11. PubMed PMID: 19332255.
259. Nath DS, Angaswamy N, Basha HI, Phelan D, Moazami N, Ewald GA, et al. Donor-specific antibodies to human leukocyte antigens are associated with and precede antibodies to major histocompatibility complex class I-related chain A in antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy after human cardiac transplantation. *Human immunology*. 2010 Dec;71(12):1191-6. PubMed PMID: 20868717. Pubmed Central PMCID: 2995271.
260. Uzunel M, Kasimu H, Joshi M, Ge X, Liu J, Xu B, et al. Evidence for no relevance of anti-major histocompatibility complex class I-related chain a antibodies in liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2008 Dec;14(12):1793-802. PubMed PMID: 19025915.
261. Stastny P, Zou Y, Fan Y, Qin Z, Lavingia B. The emerging issue of MICA antibodies: antibodies to MICA and other antigens of endothelial cells. *Contributions to nephrology*. 2009;162:99-106. PubMed PMID: 19001817.
262. Luo L, Li Z, Wu W, Luo G, Xu C, Sun Z, et al. Role of MICA antibodies in solid organ transplantation. *Clinical transplantation*. 2013 Dec 24. PubMed PMID: 24372774.
263. Zhang S, Hue S, Sene D, Penfornis A, Bresson-Hadni S, Kantelip B, et al. Expression of major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor-beta in the liver of humans with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites? *The Journal of infectious diseases*. 2008 May 1;197(9):1341-9. PubMed PMID: 18422447.
264. Luo L, Lu J, Wei L, Long D, Guo JY, Shan J, et al. The role of HIF-1 in up-regulating MICA expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation. *BMC cell biology*. 2010;11:91. PubMed PMID: 21092233. Pubmed Central PMCID: 3000391.
265. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature immunology*. 2001 Mar;2(3):255-60. PubMed PMID: 11224526.
266. He Y, Li S, Feng L, Cheng F, Ye Z, Li Y. Effect of cyclosporine on expression of MIC in human hepatocytes. *Transplantation proceedings*. 2006 Sep;38(7):2231-3. PubMed PMID: 16980050.

-
267. He Y, Li YP, Li SF, Long D. [Effect of hypoxia/reoxygenation (H/R) on expression of MICA and MICB in human hepatocytes]. *Sichuan da xue xue bao Yi xue ban* = Journal of Sichuan University Medical science edition. 2005 Mar;36(2):157-60. PubMed PMID: 15807254.
268. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, Leuvenink HG, van der Heide JJ, van Goor H, et al. Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney. *Transplantation proceedings*. 2005 Jan-Feb;37(1):367-9. PubMed PMID: 15808646.

Anexo

Preformed Antibodies Detected by Cytotoxic Assay or Multibead Array Decrease Liver Allograft Survival: Role of Human Leukocyte Antigen Compatibility

Marcela Castillo-Rama,¹ Maria Jose Castro,¹ Ivan Bernardo,¹ Juan Carlos Meneu-Diaz,² Almudena Moreno Elola-Olaso,² Sara M. Calleja-Antolin,¹ Eva Romo,¹ Pablo Morales,¹ Enrique Moreno,² and Estela Paz-Artal¹

¹Department of Immunology and ²Digestive and Abdominal Transplant Surgery, Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain

The significance of human leukocyte antigen (HLA) compatibility and preformed antibodies in liver transplantation remains unclear. The objectives of this study were to evaluate, in a single-center cohort comprising 896 liver transplants, whether the degree of donor-recipient compatibility and preformed antibodies modified graft survival. Univariate Kaplan-Meier analysis demonstrated that donor-recipient HLA compatibility had a marginal impact on allograft survival. As for compatibility at individual antigen loci, 2 mismatches at HLA-A conferred a survival advantage in retransplanted allografts ($P = 0.011$). HLA-B and HLA-DR loci did not play a significant role in outcome in any pathology. The concordance of results on preformed antibodies detected by complement-dependent cytotoxicity (CDC) and a multiple bead assay (Luminex® xMAP) showed a strong correlation between both techniques ($P < 0.0001$). Both CDC-detected and Luminex-detected antibodies were associated with shorter graft survival within the first year post-transplant ($P = 0.01$ and $P = 0.016$, respectively). Positive CDC T crossmatches and Luminex-detected HLA class II antibodies played a significant role in decreasing graft survival ($P = 0.043$ and $P = 0.0019$ at 1 year, respectively, and $P = 0.005$ and $P = 0.038$ at 5 years, respectively). A correlation was also observed between the presence of preformed Luminex-detected class II or Luminex I and II antibodies and allograft rejection ($P = 0.001$ and $P = 0.042$, respectively). In conclusion, although HLA typing is not a prerequisite for transplantation, screening of HLA antibodies with Luminex techniques and CDC crossmatch may be useful in the detection of at-risk patients that could benefit from increased surveillance and tailored therapy following transplantation. *Liver Transpl* 14:554-562, 2008.

© 2008 AASLD.

Received June 26, 2007; accepted October 29, 2007.

In many end-stage liver diseases, hepatic transplantation often constitutes the only therapeutic option available.¹⁻³ Studies performed in clinical solid organ transplants have endeavored to gain insight into immunological parameters that could be important in altering the course of allograft tolerance, thus modifying the prognosis.

Two main factors, donor-recipient human leukocyte antigen (HLA) compatibility and the absence of preformed, donor-specific anti-HLA cytotoxic antibodies (giving rise to a positive crossmatch), are known to contribute to a more favorable outcome in renal⁴⁻⁶ and heart transplants.⁷ This has not been the case in liver transplantation. Over the past 2 decades, opinions

Abbreviations: Ab-neg, antibody-negative; Ab-pos, antibody-positive; CDC, complement-dependent cytotoxicity; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HLA, human leukocyte antigen; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; MM, mismatches; NS, not significant; OLT, orthotopic liver transplantation; PRA, panel reactive antibody; SD, standard deviation.

Supported by grants from Fundacion Mutua Madrileña (2004-008 and 2005-095).

Address reprint requests to M. Castillo-Rama, Department of Immunology, Hospital Doce de Octubre, Avenida de Cordoba s/n, 28041, Madrid, Spain. Telephone: +91 390 8315; FAX: +91 390 8399; E-mail: mcastillo.hdoc@salud.madrid.org

DOI 10.1002/lt.21408

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

have been divided, with some groups supporting the detrimental role of HLA incompatibility and presensitization of recipients in the survival of liver grafts⁸ and others rejecting their impact on prognosis.^{9,10} In the largest multicenter cohort of liver transplant patients, Navarro and coworkers¹¹ observed that HLA matching had no clinically significant impact on transplant outcome. Similarly, Neumann and coworkers¹² had previously reported in a single-center analysis that HLA compatibility had no effect on graft survival. In contrast, Nikaein and coworkers¹³ demonstrated increased survival in transplants in which there was a greater degree of HLA donor-recipient compatibility. Markus and coworkers¹⁴ showed that diminished allograft survival was associated with HLA compatibility, but in retransplants, a higher incidence of failure due to rejection correlated with a lower degree of HLA compatibility. The authors explained this apparent contradiction by conferring a dualistic effect to HLA compatibility, by which it could reduce rejection yet simultaneously initiate a cascade of immunological mechanisms leading to graft loss, particularly in patients at risk of suffering recurrent autoimmune disease or infection.

The significance of preformed antibodies in the liver recipient also remains controversial. Although not all authors have described this phenomenon,^{15,16} some groups have reported that liver transplants can absorb circulating antibodies and protect subsequent kidney grafts transplanted across a positive crossmatch.^{17,18} Definitive conclusions, however, have been difficult to establish because published series comprise few recipients with preformed antibodies. More importantly, discrepancies exist when the sensitization status of patients is defined because the different techniques for the detection of antibodies [complement-dependent cytotoxicity (CDC) crossmatch and its variants, flow cytometry crossmatch, panel reactive antibody (PRA), flow cytometry PRA, and enzyme-linked immunosorbent assay] do not provide completely equivalent information. The more recent microsphere-based suspension array technology, Luminex,¹⁹ can detect non-donor-specific and donor-specific immunoglobulin G (IgG) anti-HLA antibodies. By exclusion of non-HLA and immunoglobulin M (IgM) antibodies, including most autoantibodies, the specificity of this technique is also higher. Furthermore, non-complement-fixing IgG HLA antibodies that can be clinically relevant can also be detected.²⁰ In kidney transplantation, Luminex-detected anti-HLA antibodies have been shown to maintain a correlation with transplant outcome.²¹⁻²³ To our knowledge, however, the present study is the first described in the literature to employ Luminex techniques in liver transplantation.

The aims of this study were to investigate the role of HLA mismatching on the outcome of liver transplantation in a large single-center series and to analyze if the degree of histocompatibility in the setting of different base pathologies modified graft outcome. Additionally, we sought to examine the influence of preformed antibodies on liver allograft survival and rejection and to

compare results obtained by CDC or by a multiplexed bead based assay, Luminex® xMAP.

PATIENTS AND METHODS

This study was approved by the Institutional Review Board of the Doce de Octubre Hospital.

Population

We retrospectively analyzed 896 consecutive orthotopic liver transplants performed at our center for the treatment of end-stage liver disease between March 1986 and May 2006. Selection of allograft recipients was based on various criteria including Child-Turcotte-Pugh score, ABO compatibility, donor-recipient size matching, and time on the waiting list. Although the Model for End-Stage Liver Disease score, based on severity of illness,^{24,25} is taken into account at our center, it is not determinant in recipient selection. Graft loss was defined as death of the patient or loss of the graft due to any of the following: vascular complications, bile duct complications, infection, renal failure, respiratory failure, gastrointestinal hemorrhage, malignancy, disease recurrence, rejection, multisystem organ failure, primary graft dysfunction, or other non-transplant-related cause. Patients who died or lost their graft within the first week post-orthotopic liver transplantation were excluded (n = 38).

Immunosuppression

Immunosuppression consisted of double therapy (Prograf® and prednisone) or triple therapy (cyclosporine A, prednisone, and azathioprine) until 1997. Thereafter, because of the increased risk of myelosuppression, azathioprine was substituted by mycophenolate mofetil.

The current treatment protocol includes Prograf® (adults: 0.10-0.20 mg/kg/day, children: 0.30 mg/kg/day) plus prednisone (20 mg/day tapering regime until withdrawal 3-6 months post-operation). For patients with an increased risk of rejection, previous rejection episodes, or renal toxicity, the protocol is mycophenolate mofetil (750-1000 mg/12 hours) and prednisone plus/or minus Prograf® (used at a reduced dose or suspended if there is renal toxicity).

Rejection

Rejection episodes were suspected in cases of deranged liver function tests and clinical deterioration of the patient. In all cases, rejection was confirmed by graft biopsy.

Liver biopsy results were available in 753 transplants. Histopathological evaluation was performed following the Banff schema for liver allograft grading.²⁶

HLA Typing

HLA-A, HLA-B, and HLA-DR donor and recipient typing was performed by a standard microlymphocytotoxicity technique using HLA alloantisera from International Histocompatibility Workshops until 1996. Thereafter,

commercially available typing trays with anti-HLA monoclonal antibodies (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) were employed.

CDC Crossmatch

Direct antibody cytotoxicity was performed on recipient sera drawn immediately before transplantation and before administration of any blood products. Lymphocyte populations from the spleen or lymph node were obtained by mechanical disruption and density gradient centrifugation. Donor T and B cell lymphocytes were isolated, and the microlymphocytotoxicity assay was performed according to a modified National Institutes of Health standard procedure. A crossmatch was considered positive if cell death above background was $\geq 20\%$ with T or total lymphocytes or $\geq 40\%$ with B cell donor lymphocytes.

Antibody Screening by Luminex xMAP Technology

Pretransplant sera were retrospectively analyzed for HLA I and II antibodies by a multiplexed microsphere-based suspension array, Luminex xMAP technology (Luminex Corp., Austin, TX).

Briefly, 2.5 μL of LABScreen® Mixed (One Lambda) color-coded microbeads coated with purified HLA antigens were incubated in the dark for 30 minutes at 20°C to 25°C with 10 μL of pretransplant sera. Any HLA antibodies present in the sera were bound to the LABScreen Mixed surface antigens coating the microbead and were subsequently labeled with R-phycoerythrin conjugated goat anti-human IgG. The microbead fluorescent emission of R-phycoerythrin was then detected and quantified by the LABScan™ 100 flow analyzer (One Lambda).

The determination of positive and negative sera was performed with One Lambda software (LABScreen306) according to the manufacturer's guidelines (One Lambda). Reactivity of sera was assessed by the fluorescent signal for each HLA-coated bead following correction for nonspecific binding to the negative control bead. In the LABScreen® Mixed assay, the normalized fluorescent signal is equal to the value of the class I or II coated bead minus the value of the negative control bead. If any one bead in the mixed assay is positive, the result is considered positive.

Cut-off values were established, as recommended by the manufacturers, based on standards of our laboratory after having confirmed that results of 300 well-characterized sera previously studied by alternative techniques (LAT™ Mixed trays, One Lambda) correlated well with those obtained by the LABScreen® Mixed assay.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL). Actuarial survival was calculated at 1, 3, and 5 years with the life

TABLE 1. Patient Characteristics

	n = 896	%
Age < 15 years		
Number	115	13
Mean \pm SD	5.5 \pm 4.58	
Age > 15 years		
Number	781	87
Mean \pm SD	49.9 \pm 11.5	
Diagnosis		
Hepatitis C	239	26.7
Alcoholic cirrhosis	144	16.1
Cryptogenic cirrhosis	123	13.7
Carcinoma	58	6.5
Hepatitis B	54	6.0
Primary biliary cirrhosis	36	4.0
Fulminant hepatitis	32	3.6
Biliary atresia	31	3.5
Metabolic and congenital	32	3.6
Others	26	2.9
Primary sclerosing cholangitis	7	0.8
Retransplants	114	12.7

Abbreviation: SD, standard deviation.

table method, whereas cumulative survival was analyzed with the Kaplan-Meier technique. The log rank test was used to estimate statistical significance, which was established at $P \leq 0.05$. The correlation between techniques (CDC versus Luminex) and between allograft rejection and the presence of Luminex-detected preformed antibodies was determined with 2×2 tables and the likelihood ratio chi-square test.

RESULTS

Table 1 summarizes the characteristics of the patients included in this study.

Influence of HLA Compatibility on Allograft Survival

Complete donor-recipient HLA-A, HLA-B, and HLA-DR typing was available in 853 transplants.

In order to investigate the influence of HLA compatibility on survival, allografts were categorized into 2 groups [0-3 mismatches (0-3MM) versus 4-6MM], 3 groups (0-4MM, 5MM, or 6MM), or 4 groups (0-3MM, 4MM, 5MM, or 6MM), and Kaplan-Meier estimates of survival were performed initially on the entire cohort and subsequently stratified into adult ($n = 741$) and pediatric ($n = 112$) populations. Overall, donor-recipient antigen compatibility had a negligible impact on survival at 5 years when 0-3MM and 4-6MM groups were compared (Fig. 1). This was also observed when the entire population was further categorized into 3 and 4 groups (results not shown). The same trend was observed in adult and pediatric patients when groups were analyzed separately. Because the cohort of liver recipients included patients with distinct base pathologies, we explored whether the impact of HLA compatibility on graft survival was different with respect to the

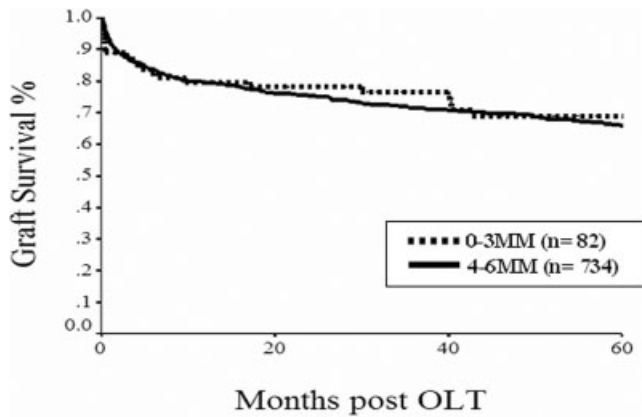


Figure 1. Kaplan-Meier curves of survival in liver allograft recipients based on the number of human leukocyte antigen mismatches (MM) between donor and recipient ($P = 0.68$, not significant). Abbreviation: OLT, orthotopic liver transplantation.

recipients' underlying disease process (Table 1). In the diagnostic subsets, differences in survival stratified by HLA-MM were not significant. Finally, the effect of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR compatibility was analyzed separately in retransplants ($n = 95$). In this group, survival was up to 15% greater in highly mismatched allografts (4-6MM) versus those with 0-3MM. This observation reached statistical significance in children (0% survival in the 0-3MM group versus 82% in the 4-6MM group, $P < 0.0001$).

Influence of Individual HLA Antigen Loci on Survival

As for individual antigen loci, donor-recipient HLA-A typing was available in 886 allografts, HLA-B typing was available in 883, and HLA-DR typing was available in 854. Recipients were stratified into 3 groups of 0MM, 1MM, or 2MM per HLA locus. When analyzing the influence on allograft survival of mismatches within individual antigen loci, we found that actuarial survival at 5 years was virtually the same, regardless of the number of mismatches at the HLA-A, HLA-B, or HLA-DR loci.

A comprehensive analysis investigating the influence of mismatches within different antigen loci was subsequently performed on each etiology. Significant differences in survival were observed at 1, 3, and 5 years in the retransplant and hepatitis B subgroups. In both cases, survival at 5 years in liver allografts with 2MM at the HLA-A locus was greater than in grafts with 1MM or 0MM ($P = 0.011$ and $P = 0.0192$ in each subgroup, respectively). Compatibility at HLA-B and HLA-DR loci did not seem to play a role in graft survival in the different diagnostic subsets.

Influence of Preformed Antibodies on Survival

Of the total transplants analyzed (primary and retransplants), 755 (89.5%) tested negative for the presence of anti-donor preformed antibodies by CDC (crossmatch

with T and/or B cells), and 89 (10.5%) tested positive. Kaplan-Meier estimates of allograft survival based on crossmatch were lower in patients with a positive crossmatch compared to those with a negative crossmatch. Survival in the CDC-positive group at 1, 3, and 5 years was 72%, 65%, and 56%, whereas in the CDC-negative group, it was 83%, 77%, and 72%, respectively. Overall, we found a highly significant association between anti-donor preformed antibodies detected by CDC and decreased survival at 1, 3, and 5 years ($P = 0.01$, $P = 0.015$, and $P = 0.004$, respectively). Thereafter, the influence on survival of CDC-detected preformed antibodies was studied by stratification of the entire cohort by individual pathologies. The presence of preformed donor-specific antibodies had only a statistically significant effect, decreasing survival in alcoholic cirrhosis recipients at 5 years post-orthotopic liver transplantation ($n = 140$, $P = 0.0011$).

A comprehensive analysis was carried out by calculation of survival in separate subgroups of positive and negative crossmatches performed exclusively with T lymphocytes (CDC T), B lymphocytes (CDC B), or both types of cells (CDC T and B; Table 2). Significant differences in survival were associated with CDC T crossmatches, as better graft outcomes were observed in CDC T-negative patients versus CDC T-positive patients at 1, 3, and 5 years ($P = 0.043$, $P = 0.036$, and $P = 0.005$, respectively). However, the antibodies detected by crossmatches performed with B lymphocytes did not seem to play a role in graft outcome.

Eight hundred ten sera (90%) of the original group were subsequently analyzed retrospectively for HLA I and II antibodies by a multiplexed bead assay, Luminex xMAP. Of the 810 sera tested, 79.7% ($n = 646$) were negative and 20.2% ($n = 164$) were positive for HLA class I and/or HLA class II antibodies. Survival in the Luminex-positive group at 1, 3, and 5 years was 75%, 70%, and 65%, whereas in the Luminex-negative group, it was 83%, 77%, and 71%, respectively. The differences observed between the 2 cohorts were significant at year 1 ($P = 0.0158$) but not at year 3 or year 5.

An analysis of the influence on survival of preformed antibodies detected by Luminex xMAP was performed by stratification of the entire cohort by individual pathologies. In the alcoholic cirrhosis group, differences in survival were noted between the patients with preformed antibodies and those without antibodies, and these differences were significant at 1, 3, and 5 years ($n = 136$, $P = 0.0009$, $P = 0.0015$, and $P = 0.0039$, respectively). No other significant differences were observed in the remaining pathologies.

The total group of patients was further categorized into positive and negative for class I antibodies, class II antibodies, and both after analysis of the sera by the Luminex technique, and survival was individually calculated for each group (Table 2). Although the absence of HLA class I antibodies improved survival only at the first year ($P = 0.038$), HLA class II antibodies significantly reduced graft survival throughout the study ($P = 0.0019$, $P = 0.03$, and $P = 0.038$ at 1, 3, and 5 years, respectively).

TABLE 2. Graft Survival (%) in CDC T and B, Luminex Anti-HLA Class I and II Positive and Negative Cohorts

	Luminex I (n = 810)			CDC T (n = 842)			Luminex II (n = 810)			CDC B (n = 423)			Luminex I and II (n = 715)			CDC T and B (n = 387)		
	Ab-pos (n = 115)	Ab-neg (n = 695)	P	Ab-pos (n = 57)	Ab-neg (n = 785)	P	Ab-pos (n = 118)	Ab-neg (n = 692)	P	Ab-pos (n = 59)	Ab-neg (n = 364)	P	Ab-pos (n = 69)	Ab-neg (n = 646)	P	Ab-pos (n = 27)	Ab-neg (n = 360)	P
1 year	75%	83%	0.038	72%	82%	0.043	71%	84%	0.0019	70%	78%	NS	68%	83%	0.0018	67%	77%	NS
3 years	70%	77%	NS	65%	77%	0.036	67%	77%	0.03	61%	69%	NS	64%	77%	0.0189	56%	69%	NS
5 years	66%	71%	NS	54%	71%	0.005	62%	72%	0.038	53%	62%	NS	61%	71%	NS	44%	61%	NS

Abbreviations: Ab-neg, antibody-negative; Ab-pos, antibody-positive; CDC, complement-dependent cytotoxicity; HLA, human leukocyte antigen; NS, not significant.

To determine the degree of concordance between the 2 techniques, we analyzed how anti-donor antibodies previously detected by CDC correlated with results obtained by Luminex. In all cases, the correlation between CDC and Luminex—CDC T versus Luminex class I (n = 799), CDC B versus Luminex I and Luminex II (n = 400), and CDC T and B versus Luminex class I and II (n = 315)—was statistically significant ($P < 0.0001$, Table 3).

Small numbers of patients were positive for CDC but negative for Luminex (see groups of n = 22, n = 26, n = 28, and n = 5 in Table 3, sections A, B, C, and D). This difference in CDC and Luminex results could be attributed to the presence of IgM antibodies or non-HLA antibodies not detected by the microbead assay. Conversely, groups of 79, 30, 38, and 9 patients were negative for CDC T, CDC B, and CDC T and B, respectively, but showed antibodies detected by the more sensitive Luminex technique.

To explore whether the negative effect of Luminex-detected antibodies on graft outcome was independent of CDC positivity, survival was calculated and compared in cohorts of both Luminex-negative and CDC-negative patients versus Luminex-positive and CDC-negative patients (comparisons of cohort a versus cohort b, cohort c versus cohort d, cohort e versus cohort f, and cohort g versus cohort h in Table 3). In all 4 comparisons, graft survival was lower in Luminex-positive cohorts versus Luminex-negative cohorts. This difference reached statistical significance in cohort g versus cohort h ($P = 0.0095$). This suggests that antibodies exclusively detected by Luminex decrease graft survival, regardless of results obtained by CDC cross-match.

Luminex-Detected Preformed Antibodies and Allograft Rejection

Acute or chronic rejection occurred in 355 (47%) of the 753 transplants for which rejection data were available. Of this total, 319 had acute rejection episodes, 18 had chronic rejection, and the remaining 18 had both acute and chronic rejection within the study period.

An analysis of correlation was performed to investigate if there was any relationship between the presence of Luminex-detected antibodies and rejection. In the category of global rejection (acute and/or chronic, n = 355) versus Luminex class I, Luminex class II, and Luminex class I and II detected antibodies, we found that in all cases rejection was more frequent in patients positive for preformed antibodies. This reached statistical significance in the Luminex II-positive patients ($P = 0.001$) and in the Luminex I and II-positive patients ($P = 0.042$).

In the category of acute rejection (episodes of acute rejection or both acute and chronic rejection, n = 319 + 18), the same trend was observed, reaching statistical significance in the Luminex class II antibody category ($P = 0.002$) and the Luminex I and II category ($P = 0.037$). Finally, in the chronic rejection category (chronic rejection or both chronic and acute rejection,

TABLE 3. Comparison Between CDC and Luminex xMAP for Anti-HLA Transplant Class I, Class II, and Class I and II Antibodies in Sera from Hepatic Transplant Patients

A. Luminex Class I (n = 799)	CDC T (n = 799)		
	Negative (n = 744)	Positive (n = 55)	Total
Luminex-negative (n = 687)	665 ^a	22	687
Luminex-positive (n = 112)	79 ^b	33	112
Total	744	55	799
B. Luminex Class I (n = 400)	CDC B (n = 400)		
	Negative (n = 343)	Positive (n = 57)	Total
Luminex-negative (n = 339)	313 ^c	26	339
Luminex-positive (n = 61)	30 ^d	31	61
Total	343	57	400
C. Luminex Class II (n = 400)	CDC B (n = 400)		
	Negative (n = 343)	Positive (n = 57)	Total
Luminex-negative (n = 333)	305 ^e	28	333
Luminex-positive (n = 67)	38 ^f	29	67
Total	343	57	400
D. Luminex I and II (n = 315)	CDC T and B (n = 315)		
	Negative (n = 294)	Positive (n = 21)	Total
Luminex-negative (n = 290)	285 ^g	5	290
Luminex-positive (n = 25)	9 ^h	16	25
Total	294	21	315

The superscripts a-h indicate cohorts of patients in which graft survival was calculated and compared. For CDC T, a crossmatch was performed with isolated T cells or total lymphocytes; for CDC B, a crossmatch was performed with isolated B cells; and for CDC T and B, both crossmatches were performed.

Abbreviations: CDC, complement-dependent cytotoxicity; HLA, human leukocyte antigen.

n = 18 + 18), there was no distinct trend observed, and no statistically significant differences were noted.

DISCUSSION

In the analysis of the entire cohort, no significant beneficial or detrimental effects associating the degree of HLA donor-recipient matching and liver graft survival have been observed. These findings are in keeping with results obtained in the 2 largest series published to date: both the single-center analysis of Neumann and coworkers¹² at the University of Berlin (n = 924) and the multicenter analysis of the United Network for Organ Sharing database (n = 28,735)¹¹ concluded that HLA matching had no significant impact on liver graft outcome. However, the degree of HLA compatibility seemed to play a role in graft survival of particular cohorts such as hepatitis B virus (HBV) or retransplanted patients. We also observed a trend toward higher survival rates in more incompatible donor-recipient pairs for the autoimmune diseases primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis (data not shown). These results agree with those published by Doran and coworkers,²⁷ who reported beneficial effects of HLA mismatching on graft survival of autoimmune

recipients, and with data by Neumann and coworkers,¹² who reported a better evolution of primary sclerosing cholangitis patients in the presence of more mismatches. Nonetheless, a larger cohort would be desirable to obtain definitive conclusions.

Our results do not demonstrate an association between HLA compatibility and graft survival in 239 patients transplanted for hepatitis C virus (HCV) infection. This result is in agreement with observations from the German series comprising 119 HCV transplants^{12,28} but contrasts with data from Belli and coworkers²⁹ reporting a beneficial effect of HLA matching in 89 HCV transplanted patients. In allografts from the HBV group, however, we noted a positive correlation between survival and highly HLA-B-compatible donor-recipient pairs (not shown). Concurrently with our data, Neumann and coworkers³⁰ observed a similar beneficial role of HLA matching in this population group. The authors noted that increased compatibility at HLA-A or HLA-B had beneficial repercussions on graft survival; this was especially true at the HLA-B locus (5-year graft survival was 79% in patients sharing 1 or more HLA-A antigens with the donor and 94% in patients sharing 1 or more HLA-B antigens with the donor). In addition, the authors reported longer graft

survival in patients with HBV reinfection and 1 or 2 HLA-B compatibilities. A possible explanation for the protective role of HLA class I compatibility is that similar HLA class I antigens on the hepatocyte surface could facilitate uninterrupted recognition of viral antigenic peptides by cytotoxic T lymphocytes after transplantation, allowing a more efficient clearance of the virus.

With respect to retransplants, we observed that higher global HLA-A, HLA-B, and HLA-DR mismatching increased liver graft survival, and this effect was mainly attributable to incompatibility at the HLA-A locus. Wong and coworkers³¹ described how patient survival at retransplantation improved with mismatching not at HLA-A but at the HLA-B and HLA-DR loci. Differences in the linkage disequilibrium and structure of HLA haplotypes in the different populations could help us to understand why a similar effect may be linked to different HLA genes.

In the second part, we aimed at studying the effect of preformed antibodies on graft survival. In our cohort, 10.5% of patients ($n = 89$) showed anti-donor-specific antibodies in pretransplant sera as detected by positive CDC crossmatch (CDC T and/or B). The frequency is consistent with that commonly reported in the literature.³² When the sera were screened for anti-HLA antibodies (class I and/or II) with the multibead assay, 20.2% ($n = 164$) yielded a positive result. This increase in frequency can be reasonably attributed to a higher sensitivity of the Luminex technique in detecting donor-specific, non-donor-specific, and some non-complement-fixing anti-HLA antibodies that can be harmful to the graft by other mechanisms.¹⁹

We observed a highly significant association between donor-specific preformed antibodies detected by positive CDC, particularly in crossmatches with T or total lymphocytes (Table 2), and decreased graft survival. An analysis of the largest series published thus far failed to demonstrate this effect of positive CDC, although it reported lower early survival rates in the positive crossmatch group ($n = 130$).³³ An absence of association between CDC crossmatch and graft survival was also observed in an analysis of 793 liver transplants with 50 positive crossmatches.³⁴ Even apparently paradoxical results have been obtained by authors reporting fewer early graft losses in patients with positive flow cytometry crossmatch.³⁵ Many studies, however, find a correlation between HLA antibodies and diminished graft survival, and most of them share in common the observation that the deleterious effect is stronger within the first year posttransplant.^{27,36-39}

To investigate whether graft survival was associated with the general status of pretransplant sensitization of patients assessed not by donor-specific crossmatch but by screening techniques, we analyzed our cohort with a Luminex assay and found that preformed antibodies (class I and/or II) affected graft survival negatively. This effect was stronger at year 1 and was maintained all along the observation time for anti-HLA class II antibodies (Table 2). Again, contradictory results are found in the literature. By using PRA, some authors described

an association of antibodies with shorter graft survival,³⁶ whereas others did not observe that correlation.^{10,40} In particular, Nikaien and coworkers⁸ did not find an association between shorter graft survival and PRA, although graft outcome was significantly dependent on positive CDC crossmatch. In contrast, 2 more recent works, using sensitive, solid-phase techniques for the detection of anti-HLA antibodies (enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry PRA),^{38,39} have shown a correlation with poor graft survival.

The association between antibodies and graft survival was observed not in any of the individual pathologies but in the alcoholic cirrhotic recipients. This finding may add further evidence in support of the role of preformed antibodies in graft loss because other factors causing graft deterioration such as recurrent viral infection or autoimmunity are less likely to be acting on the alcoholic cirrhosis cohort.

In addition to the aforementioned epidemiological studies, other data have been published supporting the role of antibodies in liver transplantation outcome. In the past, the presence of donor-specific antibodies to class I antigens was associated with the bile duct loss encountered in chronic rejection.^{41,42} Subsequently, the Pittsburgh group reported that in patients with high titers of anti-donor IgG lymphocytotoxic antibodies and persistent positive crossmatch after transplantation, a specific syndrome with low complement activity, increased circulating immune complexes, and refractory thrombocytopenia leading to a higher incidence of graft failure was observed.⁴³ More recently, the same center has shown that in a study of 17 transplant recipients withdrawn from any immunosuppression and with stable graft function, all of them lacked donor-specific antibodies.⁴⁴ Liver biopsies from acute and chronic rejection allografts show immunoglobulin deposition on biliary epithelium and vascular endothelial cells.⁴⁵ In addition, a cellular-independent, direct injury of graft parenchymal cells by donor reactive alloantibodies has been recently demonstrated in a mouse allogeneic liver transplant model. In this study, the passive transfer of alloantibodies into T-deficient and B-deficient recipients was sufficient to cause rejection of hepatocellular grafts.⁴⁶ Recent studies from several groups have reported that an important proportion of clinical liver biopsies with specific signs of acute cellular and chronic rejection show deposition of C4d, a marker of immunoglobulin-dependent activation of complement, strongly suggesting a role for a humoral component in liver allograft failure.⁴⁷⁻⁵¹ All these data are in line with our findings that increased rejection episodes were predominantly observed in allografts positive for Luminex-detected class II antibodies.

On the basis of the results reported here, we conclude that differences in HLA compatibility have an impact not on global liver allograft survival but on selective recipient groups, and donor-recipient HLA typing should not be routinely performed in liver transplantation. On the other hand, screening of HLA antibodies with the Luminex technique and CDC crossmatch may have important implications for graft survival. Informa-

tion on the sensitization status would allow the detection of at-risk patients requiring closer surveillance and tailored immunosuppressive therapy.

ACKNOWLEDGMENT

We are indebted to Esther Clemente Martinez and Alicia Muñoz Ortiz of the Department of Transplant Surgery for their assistance.

REFERENCES

- Consensus conference on indications of liver transplantation. *Hepatology* 1994;20:S1-S68.
- Neuberger J. Liver transplantation. *J Hepatol* 2000; 32(suppl 1):198-207.
- Strong RW. Liver transplantation: current status and future prospects. *JR Coll Surg Edinb* 2001;46:1-8.
- Cecka JM. The changing role of HLA matching. In: Terasaki PI, ed. *Clinical Kidney Transplants*. Los Angeles, CA: UCLA Tissue Typing Laboratory; 1986:141.
- Opelz G. Effect of HLA matching in 10,000 cyclosporine-treated cadaver kidney transplants. *Transplant Proc* 1987; 19:641.
- Sanfilippo F, Vaughn WK, Spees EK, Light JA, LeFor WM. Benefits of HLA-A and HLA-B matching on graft and patient outcome after cadaveric-donor renal transplantation. *N Engl J Med* 1984;311:358.
- Opelz G, Wujciak T. The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. The Collaborative Transplant Study. *N Engl J Med* 1994;330:816-819.
- Nikaein A, Backman L, Jennings L, Levy M, Goldstein R, Gonwa T, et al. HLA compatibility and liver transplant outcome: improved patient survival by HLA and cross-matching. *Transplant Proc* 1995;27:1186-1188.
- Lobo PI, Spencer C, Douglas MT, Stevenson WC, Pruett TL. The lack of long-term detrimental effects on liver allografts caused by donor-specific anti-HLA antibodies. *Transplantation* 1993;55:1063-1066.
- Donaldson PT, Thomson LJ, Heads A, Underhill JA, Vaughan RW, Rolando N, et al. IgG donor-specific cross-matches are not associated with graft rejection or poor graft survival after liver transplantation. *Transplantation* 1995;60:1016-1023.
- Navarro V, Herrine S, Katopes C, Colombe B, Spain CV. The effect of HLA class I (A and B) and class II (DR) compatibility on liver transplantation outcomes: an analysis of the OPTN database. *Liver Transpl* 2006;12:652-658.
- Neumann UP, Guckelberger O, Langrehr JM, Lang M, Schmitz V, Theruvath T, et al. Impact of human leukocyte antigen matching in liver transplantation. *Transplantation* 2003;75:132-137.
- Nikaein A, Backman L, Jennings L, Levy MF, Goldstein R, Gonwa T, et al. HLA compatibility and liver transplant outcome. *Transplantation* 1994;58:786-792.
- Markus BH, Duquesnoy RJ, Gordon RD, Fung JJ, Vanek M, Klintmalm G, et al. Histocompatibility and liver transplant outcome. *Transplantation* 1988;46:372-377.
- Saidman SL, Duquesnoy RJ, Demetris AJ, McCauley J, Ramos H, Mazariegos G, et al. Combined liver-kidney transplantation and the effect of preformed lymphocytotoxic antibodies. *Transpl Immunol* 1994;2:61-67.
- Watson R, Kozlowski T, Nicleleit V, Woosley JT, Schmitz JL, Zacks SL, et al. Isolated donor specific alloantibody-mediated rejection after ABO compatible liver transplantation. *Am J Transplant* 2006;6:3022-3029.
- Mosconi G, Scolari MP, Feliciangeli G, Zanetti A, Zanelli P, Buscaroli A, et al. Combined liver-kidney transplantation with preformed anti-HLA antibodies: a case report. *Transplant Proc* 2006;38:1125-1126.
- Olausson M, Mjornstedt L, Norden G, Rydberg L, Molne J, Backman L, et al. Successful combined partial auxiliary liver and kidney transplantation in highly sensitized cross-match positive recipients. *Am J Transplant* 2007;7: 130-136.
- Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol* 1999;60:1293-1302.
- Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection: technology emulating biology. *Immunol Res* 2004;29:41-54.
- Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001;71:1106-1112.
- Gibney EM, Cagle LR, Freed B, Warnell SE, Chan L, Wiseman AC. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21: 2625-2629.
- Mao Q, Terasaki PI, Cai J, El-Awar N, Rebellato L. Analysis of HLA class I specific antibodies in patients with failed allografts. *Transplantation* 2007;83:54-61.
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33: 464-470.
- Narayanan Menon KV, Nyberg SL, Harmsen WS, DeSouza NF, Rosen CB, Krom RA, et al. MELD and other factors associated with survival after liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:819-825.
- Demetris AJ, Batts KP, Dhillion AP, Ferrell L, Fung J, Geller SA, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997;25:658-663.
- Doran TJ, Geczy AF, Dorothy P, McCaughan G, Sheil AGR, Süsal C, et al. A large single center investigation of the immunogenetic factors affecting liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:1491-1498.
- Langrehr JM, Puhl G, Bahra M, Schmeding M, Spinelli A, Berg T, et al. Influence of donor/recipient HLA-matching on outcome and recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:644-651.
- Belli LS, Zavaglia C, Alberti AB, Poli F, Rondinara G, Silini E, et al. Influence of immunogenetic background on the outcome of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2000;31:1345-1350.
- Neumann UP, Langrehr JM, Naumann U, Lang M, Rayes N, Steinmuller T, et al. Impact of HLA-compatibilities in patients undergoing liver transplantation for HBV-cirrhosis. *Clin Transplant* 2002;16:122-129.
- Wong T, Donladson P, Devlin J, Roger W. Repeat HLA-B and -DR loci mismatching at second liver transplantation improves patient survival. *Transplantation* 1996;61:440-444.
- Donaldson PT, Williams R. Cross-matching in liver transplantation. *Transplantation* 1997;63:789-794.
- Doyle HR, Marino IR, Morelli F, Doria C, Aldrighetti L, McMichael J, et al. Assessing risk in liver transplantation. *Ann Surg* 1996;224:168-177.
- Neumann UP, Lang M, Moldenhauer A, Langrehr JM, Glanemann M, Kahl A, et al. Significance of a T-lymphocytotoxic crossmatch in liver and combined liver-kidney transplantation. *Transplantation* 2001;71:1163-1168.
- Scornik JC, Soldevilla-Pico C, Van der Werf WJ, Hemming AW, Reed AS, Langham MR Jr, et al. Susceptibility of liver allografts to high or low concentrations of preformed an-

- tibodies as measured by flow cytometry. *Am J Transpl* 2001;1:152-156.
36. Hathaway M, Gunson BK, Keogh AC, Briggs D, McMaster P, Neuberger JM. A positive crossmatch in liver transplantation—no effect or inappropriate analysis? A prospective study. *Transplantation* 1997;64:54-59.
 37. Takaya S, Jain A, Yagihashi K, Nakamura M, Kobayashi K, Takeuchi K, et al. Increased bile duct complications and/or chronic rejection in crossmatch positive human liver allografts. *Transplant Proc* 1999;31:2028-2031.
 38. Bishara A, Brautbar C, Eid A, Scherman L, Ilan Y, Safadi R. Is presensitization relevant to liver transplantation outcome? *Hum Immunol* 2002;63:742-750.
 39. Muro M, Marin L, Miras M, Moya-Quiles R, Minguela A, Sanchez-Bueno F, et al. Liver recipients harbouring anti-donor preformed lymphocytotoxic antibodies exhibit a poor allograft survival at the first year after transplantation: experience of one centre. *Transplant Immunol* 2005;14:91-97.
 40. Gordon RD, Fung JJ, Markus B, Fox I, Iwatsuki S, Esquivel CO, et al. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery* 1986;100:705-715.
 41. Donaldson PT, Alexander GJ, O'Grady J, Neuberger J, Portmann B, Thick M, et al. Evidence for an immune response to HLA class I antigens in the vanishing-bileduct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 1987;1:945-951.
 42. Batts KP, Moore SB, Perkins JD, Wiesner RH, Grambsch PM, Krom RA. Influence of positive lymphocyte crossmatch and HLA mismatching on vanishing bile duct syndrome in human liver allografts. *Transplantation* 1988;45:376-379.
 43. Mañez R, Kelly RH, Kobayashi M, Takaya S, Bronsther O, Kramer D, et al. Immunoglobulin G lymphocytotoxic antibodies in clinical liver transplantation: studies toward further defining their significance. *Hepatology* 1995;21:1345-1352.
 44. Mazariegos GV, Zahorchak A, Reyes J, Chapman H, Gironita A, Macdade K, et al. Immunologic assays in patients successfully withdrawn from immunosuppression (IS) after liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;S8:301.
 45. Demetris AJ, Nakamura K, Yagihashi A, Iwaki Y, Takaya S, Hartman GG, et al. A clinicopathological study of human liver allograft recipients harboring preformed IgG lymphocytotoxic antibodies. *Hepatology* 1992;16:671-681.
 46. Horne PH, Lunsford KE, Eiring AM, Wang Y, Gao D, Bumgardner GL. CD4+ T-cell-dependent immune damage of liver parenchymal cells is mediated by alloantibody. *Transplantation* 2005;80:514-521.
 47. Lorho R, Turlin B, Aqodad N, Triki N, de Lajarte-Thirouard AS, Camus C, et al. C4d: a marker for hepatic transplant rejection. *Transplant Proc* 2006;38:2333-2334.
 48. Schmeding M, Dankof A, Krenn V, Krukemeyer MG, Koch M, Spinelli A, et al. C4d in acute rejection after liver transplantation—a valuable tool in differential diagnosis to hepatitis C recurrence. *Am J Transplant* 2006;6:523-530.
 49. Jain A, Mohanka R, Orloff M, Abt P, Romano J, Bryan L, et al. Characterization of CD4, CD8, CD56 positive lymphocytes and C4d deposits to distinguish acute cellular rejection from recurrent hepatitis C in post-liver transplant biopsies. *Clin Transplant* 2006;20:624-633.
 50. Dankof A, Schmeding M, Morawietz L, Gunther R, Krukemeyer MG, Rudolph B, et al. Portal capillary C4d deposits and increased infiltration by macrophages indicate humorally mediated mechanisms in acute cellular liver allograft rejection. *Virchows Arch* 2005;447:87-93.
 51. Sawada T, Shimizu A, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S. Lobular damage caused by cellular and humoral immunity in liver allograft rejection. *Clin Transplant* 2005;19:110-114.